

US04/00117

BEST AVAILABLE COPY



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07C 401/00</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/67211</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Dezember 1999 (29.12.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04418</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juni 1999 (25.06.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:              198 28 379.2      25. Juni 1998 (25.06.98)      DE              198 40 435.2      4. September 1998 (04.09.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IM-MUNDIAGNOSTIK GESELLSCHAFT FÜR PRODUKTION UND VERTRIEB VON LABORDIAGNOSTIKA MBH [DE/DE]; Wiesenstrasse 4, D-64625 Bensheim (DE). BIOMEDICA GMBH [AT/AT]; Divischgasse 4, A-1210 Wien (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ARMBRUSTER, Franz, Paul [DE/DE]; Mittelstrasse 24, D-67240 Bobenheim-Roxheim (DE). VOELTER, Wolfgang [DE/DE]; Panoramastrasse 71, D-72070 Tübingen (DE). SCHWING, Jens [DE/DE]; St. Georg Strasse 1, D-55128 Mainz (DE). BIRKMAYER, Christian [DE/DE]; Reitmorstrasse 54, D-80538 München (DE).</p>		
<p>(74) Anwälte: BENEDUM, Ulrich, Max usw.; Haseltine Lake Partners, Motorama Haus 502, Rosenheimer Strasse 30, D-81669 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DE (Gebrauchsmuster), DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p style="text-align: right;"><b>Veröffentlicht</b> Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>		
<p>(54) Title: FUNCTIONAL VITAMIN D DERIVATIVES AND A METHOD FOR DETERMINING 25-HYDROXY-VITAMIN D AND 1<math>\alpha</math>,25-DIHYDROXY-VITAMIN D</p> <p>(54) Bezeichnung: FUNKTIONELLE VITAMIN-D-DERIVATE UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON 25-HYDROXY-UND 1<math>\alpha</math>,25-DIHYDROXY-VITAMIN-D</p>		
<p style="text-align: right;">(I)</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a multifunctional vitamin D derivative of formula (I) wherein; O represents the oxygen atom of an ether group; X represents a spacer group having a length of 0.8 to 4.2 nm, for example, an amino carboxylic acid radical, an amino undecanoic acid radical, or an amino polyether radical; Y represents hydrogen or hydroxy; A represents a tracer group such as biotin, digoxigenin or another vitamin D group which are bound by a protein having a higher affinity; R represents a hydrocarbon side-group of vitamin D or vitamin D metabolites. The invention also relates to a method for quantitatively determining a 25-hydroxy-vitamin D metabolite and a 1<math>\alpha</math>,25-dihydroxy-vitamin D metabolite in a sample.</p>		

(57) Zusammenfassung

Multifunktionelles Vitamin-D-Derivat der Formel (I), worin ist: O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe; X eine Abstandsgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, bspw. ein Aminocarbonsäure-, Aminoundecansäure- oder Aminopolyetherrest; Y Wasserstoff oder Hydroxy; A eine Tracer-Gruppe wie Biotin, Digoxigenin oder eine weitere Vitamin-D-Gruppe, die von einem Protein mit hoher Affinität gebunden werden; R eine Kohlenwasserstoff-Seitengruppe von Vitamin-D bzw. Vitamin-D-Metaboliten; sowie Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metabolit in einer Probe.

*LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SJ	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NB	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

FUNKTIONELLE VITAMIN-D-DERIVATE UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG  
VON 25-HYDROXY- UND 1 $\alpha$ ,25-DIHYDROXY-VITAMIN-D

5 Die Erfindung betrifft Derivate von 25-Hydroxyvitamin-D, deren Herstellung sowie Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D in Proben.

Die D-Vitamine oder Calciferole entstehen aus ihren Provitaminen durch eine Sonnenlicht-katalysierte Spaltung des B-Rings im Sterangerüst. Ihre wichtigsten Vertreter sind Vitamin-D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) und Vitamin-D<sub>2</sub> (Ergocalciferol), welche sich nur in den Seitenketten geringfügig  
10 unterscheiden, die aber - soweit bekannt - gleich metabolisiert werden und identische biologische Wirkungen besitzen. Während Provitamin-D<sub>2</sub> mit der Nahrung aufgenommen werden muss, kann das Provitamin-D<sub>3</sub> im menschlichen Organismus gebildet werden. Soweit durch Indizes nicht näher bezeichnet, umfasst die Bezeichnung Vitamin-D nachstehend allgemein alle Vitamin-D-Formen. In der Haut gebildetes oder mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin-D wird im Plasma vom  
15 Vitamin-D-Bindungs- oder -Transportprotein (DBP) gebunden, zur Leber transportiert und dort zu 25-Hydroxyvitamin-D (25-OH-D) metabolisiert. Das Vitamin-D-bindende Protein DBP ist auch als Gc-Globulin oder *group specific component* bekannt (J.G. Haddad in J. Steroid Biochem. Molec. Biol. (1995) 53, 579-582). Über 95% des im Serum messbaren 25-Hydroxyvitamin-D ist in der Regel 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>. 25-Hydroxyvitamin-D<sub>2</sub> wird nur in höheren Anteilen gefunden, wenn  
20 die Person unter einer Medikation mit Vitamin-D<sub>2</sub> steht oder, wie in den Vereinigten Staaten häufig praktiziert, die Nahrung mit Vitamin-D<sub>2</sub> angereichert wird.

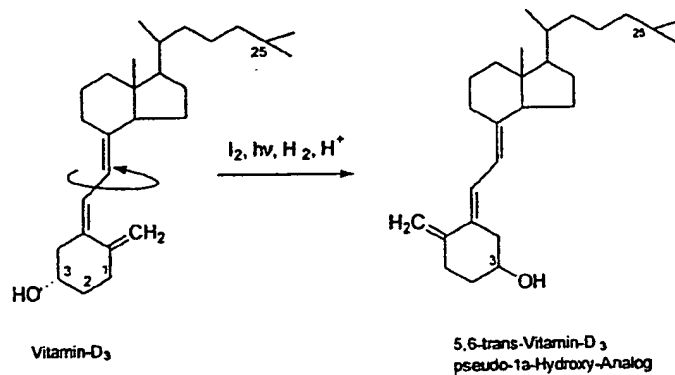
25-Hydroxyvitamin-D ist der vorherrschende Vitamin-D-Metabolit im Blutkreislauf und seine Konzentration im Serum beschreibt allgemein den Vitamin-D-Status, d.h., inwieweit dem Organismus Vitamin-D zur Verfügung steht. 25-Hydroxyvitamin-D wird bei Bedarf in der Niere zu  
25 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D metabolisiert, einer hormonartigen Substanz mit hoher biologischer Wirkung. Die Bestimmung von 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D gibt an, wieviel Vitamin-D sich in der aktivierten Form befinden.

Die Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin-D in einer Probe erfolgt bevorzugt nach dem Prinzip der kompetitive Proteinbindungsanalyse, wobei anhand der Verdrängung von radioaktivem  
30 25-Hydroxyvitamin-D von den Bindungsstellen eines Vitamin-D-bindenden Proteins das in der Probe vorhandene 25-Hydroxyvitamin-D quantifiziert wird. Daneben haben sich seit einigen Jahren Radioimmunoassays mit <sup>125</sup>I-markierten Vitamin-D-Derivaten und Antikörpern gegen Vitamin-D-Derivate in der Diagnostik etabliert. Die Angaben zum üblichen 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel im Serum schwanken je nach Labor. Es besteht aber Einigkeit dahin, dass die Konzentration von 25-  
35 Hydroxyvitamin-D im Serum in der Regel größer als 5 ng/ml und kleiner als 80 ng/ml ist. Die kompetitive Proteinbindungsanalyse verlangt den Einsatz eines radioaktiven Vitamin-D-Derivats, welches das gleiche Proteinbindungsverhalten besitzen muss wie 25-Hydroxyvitamin-D. Ähnliches gilt auch für die kompetitive Bindungsanalyse für das biologisch aktive 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D oder andere Vitamin-D-Metaboliten.

Die europäischen Patentschriften 0 312 360 und 0 363 211 sowie Tanabe et al. in J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1989, 1220-1221 und J. Nutri. Sci. Vitaminol., 1991, 37, 139-147 offenbaren verschiedene <sup>125</sup>Iod-markierte Hydroxy- und Dihydroxyvitamin-D-Derivate und deren Verwendung in Bindungsanalysen. Nachteilig an diesen Derivaten ist, dass sie problematisch herzustellen und extrem labil sind. Licht, radioaktive Strahlung, Protonen, Wasserstoff, Enzyme, freie Radikale oder die Gegenwart von Iod in freier oder gebundener Form haben großen Einfluss auf die Raumstruktur und die Bindeeigenschaften der Vitamin-D-Derivate an Vitamin-D-bindendes Protein DBP oder spezifischen Antikörpern. Sie können vor allem eine Drehung des A-Rings im Sterangerüst verursachen oder katalysieren. Die 3β-Hydroxygruppe des Vitamin-D-Moleküls wird dabei in die Pseudo-1α-Position gedreht, so dass dann das 5,6-trans-Vitamin-D vorliegt. Die sogenannten Pseudo-1α-Hydroxy-Analogen des Vitamin-D werden zwar ähnlich wie Vitamin-D metabolisiert, sie haben aber eine in wesentlichen Punkten andere Struktur und werden von Vitamin-D-bindenden Proteinen wie bspw. DBP/Gc-Globulin oder Anti-Vitamin-D-Antikörper nicht oder deutlich schlechter gebunden.

15

20

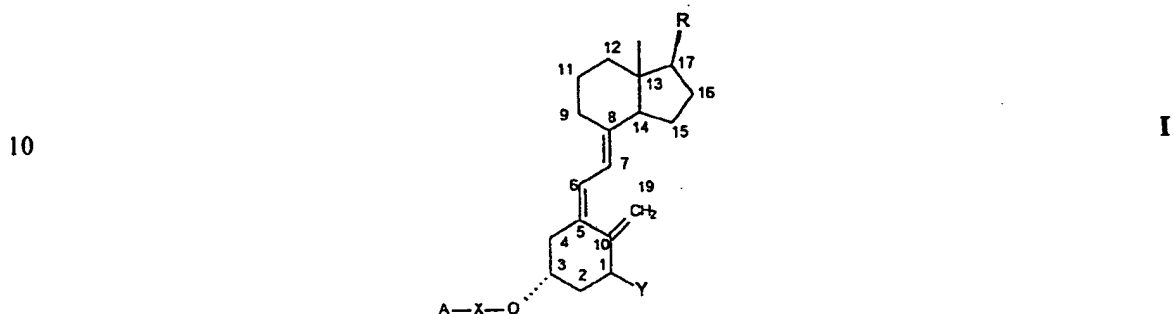


Die vorstehend beschriebene Umlagerung ist als Beispiel zu verstehen. Es treten auch andere chemische Reaktionen und Umlagerungen auf. Gleiches gilt für <sup>3</sup>H- oder <sup>14</sup>C-markierte Vitamin-D-Derivate. Auch diese Vitamin-D-Derivate sind nicht so stabil, dass sie eine zuverlässige Bindungsanalyse erlauben. Die radioaktive Markierung steigert zudem die Kosten für Lagerung, Transport und Entsorgung und ist allgemein nachteilig für Gesundheit und Umwelt. Ferner ist die Halbwertszeit von <sup>125</sup>Iod vergleichsweise kurz. Eine kompetitive Bindungsanalyse mit <sup>3</sup>H- und <sup>14</sup>C-markierten Vitamin-D-Derivaten hingegen verlangt besondere Szintillationszähler und ist apparativ anspruchsvoller, bei weitgehend gleichen Problemen.

Ray et al. in Biochemistry, 1991, 30, 4809-4813 offenbaren die Kopplung von Vitamin-D<sub>3</sub> mit verschiedenen farbgebenden Gruppen. Die Nachweisempfindlichkeit für die farbstoffmarkierten Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate ist aber zu gering, als dass man sie in einer kompetitiven Bindungsanalyse für natürliche Vitamin-D-Metabolite einsetzen könnte, abgesehen davon, dass die farbstoffmarkierten Derivate in Serum nicht stabil und zudem besonders lichtempfindlich sind.

Es ist Aufgabe der Erfindung, Vitamin-D-Derivate zur Verfügung zu stellen, die in einer kompetitiven Bindungsanalyse oder ganz generell in Immunoassays von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D eingesetzt werden können. Dies setzt folgende Eigen-

- schaften voraus, erstens, dass für die Vitamin-D-Derivate eine Nachweisempfindlichkeit besteht, welche höher ist, beziehungsweise in einem niedrigeren Konzentrationsbereich liegt, als die Konzentration der gesuchten Vitamin-D-Metabolite in den Proben; zweitens, dass die Derivate in Serum, Plasma oder Urin unter üblichen protischen Bedingungen und gegenüber Serumenzymen stabil sind; und schließlich drittens, dass die Derivate über Wochen und Monate hinreichend licht- und lagerstabil sind. Diese Aufgabe wird gelöst durch Vitamin-D-Derivate der Formel



15 worin ist:

- O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe;
- X eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoffgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, bevorzugt ein C8- bis C12-Gruppe, die übliche Heteroatome wie S, O, N oder P aufweisen kann, ganz besonders bevorzugt eine Hexamido-, Octamido- oder Decamido-
- 20 Amidopropylether-Linkergruppe;
- Y Wasserstoff oder eine Hydroxygruppe;
- A eine funktionelle Gruppe, die von einem bindenden Protein wie einem Antikörper oder Vitamin-D-bindendes Protein DBP mit hoher Affinität gebunden wird;
- R die Seitengruppe eines Vitamin-D-Metabolits, bevorzugt die Seitengruppe von Vitamin-D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub>, besonders bevorzugt die 25-hydroxylierte Seitengruppe von Vitamin-D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub>.
- 25

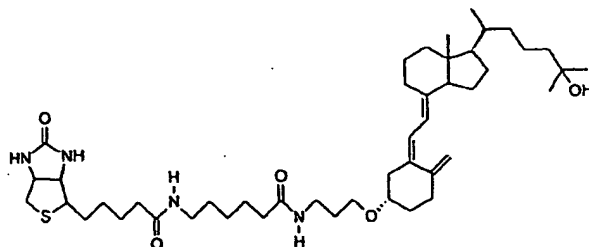
Eine hohe Affinität liegt vor, wenn die Dissoziationskonstante (K) zwischen dem bindenden Protein, z.B. dem Antikörper oder DBP, und dem Antigen bzw. der funktionelle Gruppe A größer 10<sup>8</sup> ist. Eine Dissoziationskonstante größer 10<sup>16</sup> ist für viele Anwendungen vorteilhaft. In einer bevorzugten Ausführungsform ist A ausgewählt aus Biotin, Digoxigenin, Tyrosin, substituiertem Tyrosin, substituierten Aminosäuren, charakteristischen Aminosäure- und Peptidsequenzen, FITC, Proteinen und Proteingruppen wie Protein A und Protein G oder einem weiteren Vitamin-D-Derivat, ganz besonders bevorzugt 25-Hydroxyvitamin-D.

Die Abstandsgruppe X ist bevorzugt ausgewählt aus substituierten und unsubstituierten C-Körpern mit 0,8 bis 4,2 nm, bevorzugt etwa 0,12 nm Länge. Besonders bevorzugt ist eine Aminocarbonsäure, insbesondere eine Aminoundecansäure, peptidische und Ketogruppe oder ein substituiertes oder unsubstituiertes Aminopolyetherrest mit einer Länge von 0,8 bis 4,2 nm, bevorzugt etwa 0,9 bis 1,5 nm. Dieser Abstand zwischen der Gruppe A und der Bindungs- bzw. Erkennungsstelle für den Vitamin-D-Rest ist erforderlich, dass die bindenden Proteine an die

jeweiligen Bindungsstellen binden können und dabei sich nicht gegenseitig stören. Zu beachten ist, dass beispielsweise für das Vitamin-D-bindende Protein DBP (Gc-Globulin) die 19-Methylengruppe, gegebenenfalls die 1-Hydroxygruppe des A-Rings und die Vitamin-D-Seitenkette zur Erkennungsstelle gehören und in einer Bindungstasche aufgenommen werden. Ähnliches gilt auch für  
 5 spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Vitamin-D-Derivate. Ist die Abstandsgruppe X zu kurz, kann neben dem Vitamin-D-bindenden Protein kein weiteres Bindungsprotein an der gewählten funktionellen Gruppe A binden. Für das bevorzugte Beispiel heißt das, wenn sich die funktionelle Biotin-Gruppe innerhalb der Bindungstasche des Vitamin-D-bindenden Proteins befindet, ist sie für das zweite Bindungsprotein, zum Beispiel das Streptavidin, nicht mehr  
 10 zugänglich. Ist die Abstandsgruppe X hingegen zu lang, können Molekülfaltungen auftreten, welche gleichfalls die gleichzeitig Bindung zweier Bindungspartner behindern.

Daneben besitzt die erfindungsgemäße Abstandsgruppe überraschenderweise einen sterischen Effekt, als sie offenbar eine 180°-Drehung des A-Rings aktiv verhindern hilft. Es wird vermutet, ohne an diese Theorie gebunden zu sein, dass das 3 $\beta$ -Sauerstoffatom der Ethergruppe am  
 15 A-Rings entsprechend einer natürlichen Hydroxygruppe hydratisiert ist und so einen Angriff auf die 5,6-Doppelbindung verhindert, abgesehen von anderen elektronischen und sterischen Effekten. Ein anderer wichtiger Aspekt ist, dass die erfindungsgemäße Ethergruppe von den im Serum oder Plasma stets vorhandenen Esterasen nicht gespalten werden kann.

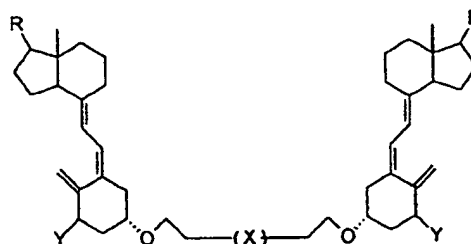
Ganz besonders bevorzugt ist 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amido-propylether der Formel II  
 20



II

und die 1 $\alpha$ -Hydroxy- und Vitamin-D<sub>2</sub>-Analoge.

Weiterhin bevorzugt sind Derivate, die als zweite funktionelle Gruppe einen Vitamin-D-Rest enthalten. Der Vorteil dieser Derivate ist, dass sie keine systemfremden Gruppen und Verbindungen enthalten und so eine erhöhte Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der kompetitiven  
 30 Bindungsanalyse erlauben, auch weil sich eventuelle Bindungsbesonderheiten aus erster und zweiter Bindung des Vitamin-D-bindenden Proteins bei einer quantitativen Bestimmung kompensieren. Besonders bevorzugt sind Verbindungen der nachstehenden Formel III:



III

worin R, Y und X wie in oben in Formel I definiert sind. Besonders günstig sind dabei symmetrische Vitamin-D-Derivate.

Die erfindungsgemäßen 25-Hydroxy- und  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Derivate sind über-  
raschend licht-, lager- und serumstabil und erlauben in allen kompetitiven immundiagnostischen  
5 Verfahren eine empfindliche, zuverlässige quantitative Bestimmung von Vitamin-D-Metaboliten  
wie 25-Hydroxy- und  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D, beispielsweise für die Routinediagnostik im  
Human- und Veterinärmedizinbereich sowie in der Forschung.

Erfindungsgemäß wird die Verbindung der Formel I erhalten durch ein Verfahren,  
umfassend die Schritte: a) Cyanoethylierung der 3-Hydroxygruppe von Vitamin-D oder 25-  
10 Hydroxyvitamin-D mit Acrylnitril in einem geeigneten Lösungsmittel wie Acetonitril in Gegenwart  
von Kaliumhydrid und tert.-Butanol; b) Reduktion der resultierenden Nitrilgruppe mit einem  
Gemisch aus Lithiumhydrid und Lithiumaluminiumhydrid zu einem Amin; und c) Anhängen einer  
Abstandsgruppe, gegebenenfalls zusammen mit einer funktionellen Gruppe A an das Amin, bspw.  
Biotinylieren der Verbindung mit einem aktivierten Biotinylierungsreagenz wie LC-BHNS oder,  
15 zum Erhalt eines Vitamin-D-Derivats gemäß Formel III, Kopplung von zwei Amino-Vitamin-D-  
Gruppen durch Kondensation mit einer Dicarbonsäure wie Sebacinsäure mittels Carbodiimid.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung funktioneller Vitamin-D-Derivate ergibt  
höhere Ausbeuten bei kürzeren Reaktionszeiten. Anders als in herkömmlichen Verfahren erfolgt  
nämlich in Schritt a) die Cyanoethylierung der 3-Hydroxygruppe in Gegenwart von Kaliumhydrid  
20 und tert.-Butanol. Dadurch wird erreicht, dass nur an der 3-Hydroxy-Gruppe von Vitamin-D eine  
Cyanoethylierung erfolgt und die andere Hydroxygruppen des Vitamin-D vor einer Umsetzung  
geschützt sind. Die Umsetzung erfolgt bei 0 bis 20°C, bevorzugt bei 5 bis 8°C in einem neutralen  
Lösungsmittel wie Acetonitril.

Bei der nachfolgenden Reduktion wird die Nitrilgruppe des Cyanoethylethers quantitativ in  
25 das Amin überführt, welches dann vergleichsweise einfach mit einer anderen funktionellen Gruppe  
verknüpft werden kann, zum Beispiel durch Umsetzung mit einem handelsüblichen Biotinylie-  
rungsreagenz.

Die Erfindung umfasst zudem die Verwendung der erfindungsgemäßen funktionellen  
Vitamin-D-Derivate in Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-  
30 Vitamin-D in Serum, Plasma, Urin oder einer anderen Probe. Hierbei wird das erfindungsgemäße  
funktionelle Vitamin-D-Konjugat entweder als Zwischenglied eingesetzt, wobei das Vitamin-D-  
bindende Protein und nativer Vitamin-D-Metabolit um die Bindestelle kompetitieren, oder selbst als  
kompetitive Bindungskomponente zu nativem Vitamin-D. Das quantitative Bestimmungsverfahren  
ist vorzugsweise ein EIA, ELISA, RIA, IRMA, LiA oder ILMA, FIA oder IFMA in manuell  
35 abzuarbeitenden Testsystemen oder auf Automaten angepasste Versionen in Flüssigphasen- wie  
Festphasentechnik.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und  $1\alpha,25$ -  
Dihydroxy-Vitamin-D-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit Strep-

tavidin, b) Zugabe ein oder mehrerer multifunktioneller Biotin-Vitamin-D-Derivate, c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D-bindendes Protein, d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern. Die Markierung der anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper kann direkt sein, bspw. eine radioaktive Markierung, oder auch indirekt, bspw. ein Enzym oder ein aktives Enzymfragment wie Peroxidase, das eine Farbreaktion zu katalysieren vermag.

Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern, b) Zugabe des Vitamin-D-Bindungsproteins, c) Zugabe der Probe sowie eine definierte Menge Biotin-Vitamin-D-Derivat, d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin. Das Streptavidin ist bevorzugt indirekt mit Peroxidase markiert; der Träger ist vorzugsweise eine Reaktionsgefäßwand, beispielsweise von einer Mikrotiterplatte, oder Teilchen aus polymerem oder magnetischem Material oder beidem, beispielsweise Kunststoff- oder Cellulose-Mikropartikel.

Diese Verfahren ermöglichen eine nicht-radioaktive quantitative Bestimmungen von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D, ohne dass aufwendige Sicherheitsvorkehrungen erforderlich sind. Die hier vorgeschlagenen kompetitiven Verfahren sind somit für Routineuntersuchungen im Rahmen einer Osteoporose-Prophylaxe, bei einer vermuteten D-Hypovitaminose oder D-Hypervitaminose, zur Diagnostik allgemeiner Art und in der Forschung.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Kit zur Bestimmung von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D, der unter anderem das erfindungsgemäße funktionelle Vitamin-D-Derivat enthält. Der Kit umfasst wahlfrei Vitamin-D-Bindungsprotein (Gc-Globulin), anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper, Streptavidin und vorbehandelte oder unvorbehandelte Mikrotiterplatten und/oder magnetische oder andere Mikropartikel und andere Reagenzien.

Weitere Vorteile, Merkmale und Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachstehenden Beispielen und den beiliegenden Zeichnungen. Es zeigt:

- Fig. 1 den schematischen Syntheseweg für das bifunktionelle Vitamin-D-Derivat 25-Hydroxy Vitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether) gemäß der Erfindung;
- Figs. 2, 3 und 4 Schemadarstellungen verschiedener ELISAs zur Bestimmung von 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-OH-Vitamin-D-Konjugat;
- Fig. 5A die Eichkurve eines kompetitiven ELISAs für 25-OH-Vitamin-D nach Fig. 2;
- Fig. 5B Eichkurven von ELISAs gemäß Fig. 5A mit 3, 60 und 100 Tage altem 25-OH-Vitamin-D-Biotin-Tracer;
- Fig. 5C die Eichkurve eines kompetitiven ELISAs für 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D analog Fig. 2;
- Figs. 6 und 7 Schemadarstellungen kompetitiver RIA für 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-OH-Vitamin-D-Konjugats;



**Figs. 8, 9 und 10** Schemadarstellungen kompetitiver, radioaktiver IRMAs für 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-OH-Vitamin-D-Konjugats;

**Figs. 11 und 12** Schemadarstellungen kompetitiver ELISAs unter Verwendung von Mikropartikeln;

**Fig. 13** Schemadarstellung eines kompetitiven Bindungsassays für 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe eines 25-OH-Vitamin-D-Konjugats gemäß der Erfindung und einem direktmarkierten Vitamin-D-bindenden Protein.

**Fig. 14** ein Blockdiagramm des Vergleichs der 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Gehalte in Seren von Dialyse- und Normalpatienten.

**Fig. 1** zeigt den erfindungsgemäßen Syntheseweg zur Herstellung des bifunktionellen 25-OH-Vitamin-D-Konjugats. Zunächst wird 25-OH-Vitamin-D in einem Gemisch aus Acetonitril, Kaliumhydrid und tert.-Butanol mit Acrylnitril cyanoethyliert. Durch die Gegenwart des als Base fungierenden Kaliumhydrids und durch die Anwesenheit von tert.-Butanol zur Abwendung unspezifischer Reaktionen an der 25-Hydroxygruppe wird erreicht, dass selektiv die 3-Hydroxy-Gruppe des Vitamin-D cyanoethyliert wird. Die Ausbeute an 25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -cyanoethylether beträgt in der Regel etwa 74% bei einer Reaktionsdauer von 40 Minuten.

Nach üblicher Aufarbeitung wird der 25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -cyanoethylether mit Lithiumhydrid versetzt und die 25-Hydroxygruppe in das Lithiumalkoholat überführt. Es folgt eine Reduktion des Nitrils mit LiAlH<sub>4</sub> zu 25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -3'-aminopropylether. Dieser Schritt ist quantitativ, ohne dass Nebenprodukte auftreten. Zuletzt erfolgt gegebenenfalls eine Biotinylierung mit einem aktivierten Biotinylierungsreagenz wie LC-BHNS (Biotinyl-N- $\epsilon$ -aminocaproyl-hydroxy-succinimidester). Die resultierende Abstandsgruppe X hat entsprechend der Aminocaproylkette eine Länge von etwa 0.8 bis 0.9 nm.

25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amido-propylether ist temperaturstabil und kann in einer wässrigen, leicht sauren Matrix über mehrere Monate gelagert werden. Da die Verbindung von Serumenzymen nicht gespalten wird, eignet sie sich bestens für diagnostische Routinetests in Serum, Plasma und Urin.

**Fig. 2** zeigt eine Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA für 25-OH-Vitamin-D. Hierbei wird das 25-OH-Vitamin-D-Konjugat (25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amido-propylether) über Streptavidin an eine feste Phase gebunden. Dann erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von Vitamin-D-bindenden Protein und 25-OH-Vitamin-D aus Standard oder Probe an das 25-OH-Vitamin-D-Konjugat. Der Nachweis erfolgt durch Peroxidase-markierte Antikörper gegen das Vitamin-D-bindende Protein. Der Fachmann weiß, dass auch andere Markerenzyme verwendet werden können, zum Beispiel alkalische Phosphatase oder Galaktosidase, etc.

**Fig. 3** zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA, wobei das Vitamin-D-bindende Protein zunächst über anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper an die feste Phase gebunden wird. Danach erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von 25-OH-Vitamin-D-Biotin und 25-OH-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe. Zur Bestimmung wird dann

Peroxidase-markiertes Streptavidin eingesetzt. Das gezeigte Prinzip lässt sich selbstverständlich auf andere Tracer-Gruppen statt Biotin und auf andere Markerenzyme, wie oben angegeben, übertragen.

Fig. 4 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA, wobei das Vitamin-D-bindende Protein direkt an die feste Phase gebunden ist. Die kompetitive Bindung von 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-Biotin und 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> aus Standard bzw. Probe erfolgt in flüssiger Phase und Peroxidase-markiertes Streptavidin wird zur quantitativen Bestimmung eingesetzt.

Fig. 5A -C zeigen die typische Eichkurven von kompetitiven ELISAs mit 25-OH-bzw 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>-Biotin gemäß dem in Fig. 2 gezeigten Prinzip. Die Menge an gebundenem Vitamin-D-Bindungsprotein wurde bestimmt durch eine standardisierte Farbreaktion mit Peroxidase-gekoppelten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern und Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat. Alternative Substrate wären beispielsweise OPD (1,2-Phenyldiamin x 2 HCl), ABTS und andere. Für die Eichkurve wurden Vitamin-D-Proben mit Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/l eingesetzt. Die Ordinate zeigt die optische Dichte als Mittelwert von zwei Messungen bei 450 nm; die Abszisse die Konzentration an 25-OH- bzw. 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D in nMol/l.

Fig. 6 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Protein-Bindungsversuch (CPBA), wobei 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-Biotin und 25-OH-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle des Vitamin-D-Bindungsproteins kompetitieren. Es wird <sup>125</sup>I-markiertes Streptavidin für die quantitative Bestimmung verwendet.

Fig. 7 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Radioimmunoassays (RIA), wobei 25-OH-Vitamin-D-Biotin und 25-OH-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle eines anti-Vitamin-D-Antikörpers kompetitieren. Für die quantitative Bestimmung wird <sup>125</sup>I-markiertes Streptavidin eingesetzt. Erfolgt die Bestimmung durch ein Streptavidin, das nicht radioaktiv, sondern mit einem Fluorophor oder Luminophor markiert ist, liegen sogenannte LIA- oder FIA-Assays vor.

Fig. 8 zeigt die Schemadarstellung eines 25-OH-Vitamin-D-IRMA. Es wird zunächst 25-OH-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an die feste Phase gebunden. Die kompetitive Bindung von Vitamin-D-Bindungsprotein an das Konjugat und 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> aus Standard oder Probe erfolgt dann in flüssiger Phase. Die Menge des Konjugat-gebundenen Bindungsproteins wird mit <sup>125</sup>I-markierten Antikörpern bestimmt.

Fig. 9 ist die Schemadarstellung einer IRMA-Sandwich-Technik (Immunoradiometrischer Assay). Hierzu werden anti-Vitamin-D<sub>3</sub>-Antikörper an die feste Phase gekoppelt. An diese binden dann Vitamin-D-Bindungsproteine. Die Kompetition erfolgt im nächsten Schritt zwischen dem 25-OH-Vitamin-D-Konjugat und 25-OH-Vitamin-D aus Standard oder Probe. Die Bestimmung der Menge gebundenes Konjugat erfolgt durch <sup>125</sup>I-markiertes Streptavidin.

Fig. 10 zeigt die Schemadarstellung eines weiteren IRMA-Sandwich-Technik. Es wird zunächst Vitamin-D<sub>3</sub>-Bindungsprotein an die feste Phase gekoppelt. Dann erfolgt daran die kompetitive Bindung zwischen dem 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-Konjugat und 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> aus

Standard oder Probe. Die Menge gebundenes Konjugat wird durch  $^{125}\text{I}$ -markiertes Streptavidin bestimmt.

Fig. 11 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA unter Verwendung von Mikropartikeln. Hierbei wird 25-OH-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird 25-OH-Vitamin-D-Derivat daran gebunden. In flüssiger Phase wird Vitamin-D-Bindungsprotein und die jeweilige Probe zugegeben. Bindungsproteine und 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> aus Standard oder Probe konkurrieren um die Bindungsstelle des Konjugats. Die gebundenen Bestandteile werden dadurch abgetrennt, dass sie über die Mikropartikel von einem Magneten zurückgehalten werden, während der Überstand mit den ungebundenen Substanzen entfernt wird. Die Menge gekoppeltes Bindungsprotein wird bestimmt in einem zweistufigen Verfahren mit einem primären Antikörper gegen Vitamin-D-Bindungsprotein und einem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper.

Fig. 12 zeigt eine Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA unter Verwendung von Mikropartikeln. Es wird 25-OH-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird die flüssige Probe mit 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> (aus Standard oder Probe) dazugegeben sowie eine nicht-sättigende Menge Antikörper. Das Konjugat und das native Vitamin-D<sub>3</sub> konkurrieren um die Bindung des Antikörpers. Die Menge gebundener Antikörper erfolgt durch Agglutination der Mikropartikel. Diese kann beispielsweise direkt durch Nephelometrie bzw. Turbidimetrie bestimmt werden.

Fig. 13 zeigt das Schema eines kompetitiven Bindungsassays, wobei das Vitamin-D-bindende Protein direkt markiert ist, beispielsweise radioaktiv mit  $^{125}\text{I}$ od, oder für eine Elektrolumineszenz mit Ruthenium(II)tris-(bipyridin)-NHS-ester. Die Markierung können auch Enzyme sein wie Peroxidase, alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase u.a., oder auch FITC.

Fig. 14 veranschaulicht in einem Blockdiagramm die unterschiedlichen 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Gehalte im Serum von Dialyse- und Normalpatienten.

Die bekannten Bestimmungsverfahren für Proteine wie der kompetitive ELISA beruhen auf dem Prinzip, dass die nachzuweisende Verbindung mit einem Bindungsprotein oder Konjugat um eine Bindungsstelle konkurriert. Es wird dann die Menge gebundenes Bindungsprotein oder Konjugat bestimmt und anhand einer Eichkurve die Konzentration der nachzuweisenden Verbindung ermittelt.

Die in den Figuren gezeigten Testprinzipien lassen sich einfach auf andere Vitamin-D-Derivate übertragen. Besonders erwähnt sei 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>. In diesem Fall muss ein Bindungsprotein bzw. ein Rezeptor oder Antikörper gewählt werden, der das 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Analoge spezifisch erkennt. Das zugehörige bifunktionelle 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyderivat kann gewonnen werden enzymatisch durch Umsetzung von 25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -cyanoethylether mit 25-OH-Vitamin-D-1 $\alpha$ -Hydroxylase, Reduktion zum Amin und schließlich Addition der zweiten funktionellen Gruppe. Ferner werden hier Derivate von Vitamin-D<sub>2</sub> und Vitamin-D<sub>3</sub> vorgeschlagen. Deren Synthese kann auf dem in Beispiel 1 vorgestellten Weg erfolgen.

## BEISPIELE

**Beispiel 1: Synthese von 25-OH-Vit.-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether (4)**

Alle Umsetzungen erfolgten im Dunkeln unter trockener Stickstoffatmosphäre. Zwischenprodukte wurden bei -20°C gelagert. Es wurden HPLC-reine Lösungsmittel eingesetzt. Das 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> war von BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg, der LC-BHNS (Long-Chain-Biotinyl-N- $\epsilon$ -aminocaproyl-hydroxysuccinimidester) von Sigma Chemie, alle weiteren Chemikalien von Fluka, Darmstadt. Die Massenspektroskopie (FAB) erfolgte mit einem Finigan-MAT-90, die NMR-Messungen mit einem Bruker-ARX-400 (400 MHz) oder einem Bruker-ARC-250F (250 MHz).

10 (i) 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -cyanoethylether (2)

5 mg 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> (12,5  $\mu$ Mol), gelöst in Methylenchlorid (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), wurde in einen mit Stickstoff gefüllten Kolben überführt und das Lösungsmittel abgezogen. Der feste Rückstand wurde in 1 ml Acetonitril aufgenommen und versetzt mit 10 Tropfen einer Mischung von tert.-Butanol und Acetonitril (9:1 v/v) sowie 130  $\mu$ Mol Acrylnitril (10 eq.) in 100  $\mu$ l Acetonitril [Stammlösung: 86  $\mu$ l Acrylnitril (1.3 mMol) verdünnt mit Acetonitril auf 1 ml]. Die klare Lösung wurde 15 Minuten bei 6°C gerührt. Es wurde 6,25  $\mu$ Mol Kaliumhydrid (0,5 eq.) in 25  $\mu$ l tert.-Butanol/Acetonitril (9:1 v/v) [Stammlösung: 10 mg KH (250  $\mu$ Mol) in 1 ml tert.-Butanol/Acetonitril (9:1 v/v)] zugegeben. Die dabei entstehende Ausflockung löste sich sofort wieder. Die Mischung wurde bei 6°C gerührt. Die wiederholte Dünnschichtchromatographie (DC) einzelner Proben mit 20% Petrolether in Methyl-tert.-butylether (MTBE) auf Kieselgel zeigte, dass nach 10 Minuten bereits 90% der Ausgangsverbindung umgesetzt waren. Nach 15 Minuten wurden wenige Tropfen Reaktionsgemisch mit etwa 5 Tropfen Wasser und 0,5 ml MTBE aufgearbeitet. Die DC der organischen Phase zeigte kein Edukt mehr. Nach 40 Minuten wurde das gesamte Reaktionsgemisch mit Wasser/MTBE aufgearbeitet. Es wurde 4 mg öliges Produkt erhalten.

25

IR (NaCl/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ):	3422	OH
	2941, 2872	CH
	2252	Nitril
	1105	Ether

30

Die HPLC-Analyse (3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ergab 93% Produkt und 7% Edukt. 4 mg Produkt enthielten somit 3.7 mg (8,2  $\mu$ Mol) Zielverbindung, was einer Ausbeute von 74% entspricht.

(ii) 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'aminopropylether (3)

3.75 mg (8.3  $\mu$ Mol) Nitril aus (i) wurde in 2 ml Ether gelöst, mit 125  $\mu$ Mol Lithiumhydrid gelöst in 1 ml Ether (Stammlösung: 7 mg frisches feinpulvrige LiH in 7 ml Ether) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Es wurde 169  $\mu$ Mol LiAlH<sub>4</sub> als Aufschlammung in 1 ml Ether (Stamm: 18 mg frisches feinpulvrige LiAlH<sub>4</sub> in 3 ml Ether) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde das Gemisch mit 1 ml konzentriertem KOH, 5 ml H<sub>2</sub>O und 4 x 20 ml MTBE aufgearbeitet. Die Dünnschichtchromatographie einer Probe mit 1:1 MTBE/Petrolether

auf Kieselgel zeigte nur noch den Ausgangspunkt. Das Diol lag bei  $R_f$  0.27; das Nitril bei  $R_f$  0.4. Die gewonnene Substanz wurde ohne weitere Analyse und Aufreinigung weiterverarbeitet.

(iii) 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether (4)

- Es wurde 3 mg (6.6  $\mu$ Mol) 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -aminopropylether (3) aus (ii) in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Dann wurde unter Stickstoff 3 mg (6.6  $\mu$ Mol) LC-BNHS und 1  $\mu$ l (17.5  $\mu$ Mol) Triethylamin zugegeben. Es wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, das DMF abgezogen und der Rückstand mit 20% Methanol (MeOH) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> vorgereinigt. 12 mg (> 100%) der so gewonnenen Substanz wurden mittels HPLC gereinigt (Bedingungen: Knauer Kromasil-100, 5  $\mu$ M, 250 x 4 mm, 10% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1,5 ml/min, OD 265 nm, 7 Minuten). Die Ausbeute betrug 1,2 mg (1,5  $\mu$ Mol). Dies entspricht 12%, bezogen auf das 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> und 18% bezogen auf die Nitrilverbindung.

Tabelle I

Biotin-25-OH-Vitamin-D <sub>3</sub>				
	H	Mult	cc [Hz]	Zuordnung
6,42	1	Dd	5,7	NH (Biotin)
6,2	1	D	11	6
6,0	1	D	11	7
5,85	1	Dd	5,7	NH (Biotin)
5,55	2	M		3-O-CH <sub>2</sub> (28)
5,38	1	S		NH oder OH
5,05	1	D	2	19
4,83	1	D	2	19
4,77	1	S		NH oder OH
4,51	1	M		HC-NH I Biotin
4,33	1	M		HC-NH II Biotin
3,53	1	M		3
2,53	1	D	10	4
1,21	6	S		26, 27-CH <sub>3</sub>
0,93	3	D	6	21-CH <sub>3</sub>
0,54	3	S		18-CH <sub>3</sub>

15

MS (Finigan MAT 90); (FAB): 797 (MH<sup>+</sup>) vom 5.9.97 und 28.11.97; <sup>1</sup>H-NMR (Bruker ARX 400) in CDCl<sub>3</sub>/TMS bei 400 MHz. Die Analysedaten sind in Tabelle I gezeigt.

Beispiel 2: Stabilität von 25-OH-Vit.-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether

20

Es wurde jeweils 20 mg gereinigte 25-OH-D<sub>3</sub>-Biotin-Verbindung (25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3'[6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether) aus Beispiel 1 in ein NMR-Röhrchen gegeben und mit 1 ml Lösungsmittel versetzt. Das Lösungsmittel war eine Mischung aus Deuteriochloroform-<sup>2</sup>:Deuteroacetonitril:D<sub>2</sub>O im Verhältnis 3:2:1 mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5. Die Proben

wurden 200 Tage unter nachstehenden Bedingungen gelagert und in regelmäßigen Abständen die NMR-Spektren untersucht.

- Probe 1: unter Lichtausschluss bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ;  
 5 Probe 2: unter Lichtausschluss bei  $+4-6^{\circ}\text{C}$ ;  
 Probe 3: unter Lichtausschluss bei Umgebungstemperatur;  
 Probe 4: unter starker Lichteinwirkung (auf der Fensterbank) bei Umgebungstemperatur.

Die Proben 1 und 2 zeigten über die ganzen Zeit keine wesentlichen Veränderungen im  
 10 NMR-Spektrum. Eine HPLC-Analyse bestätigte, dass die Proben 1 und 2 auch nach 200 Tagen protisches Lösungsmittel intakt waren. Probe 3 zeigte eine minimale Veränderung im NMR-Spektrum nach 100 Tagen. Die HPLC-Analyse ergab, dass mehr als 78% der Verbindung noch intakt war. Probe 4 war nach 2 Monaten abgebaut. Die Stabilitätsuntersuchung zeigt, dass die Verbindung unter Ausschluss von Licht sehr beständig ist, selbst in protischen Lösungsmitteln und ohne Kühlung.

15 **Beispiel 3: 25-Hydroxyvitamin-D-ELISA mit 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3' [6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether**

Die Bestimmung erfolgte nach dem in Fig. 2 gezeigten Prinzip. Hierzu musste zunächst 25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether über Streptavidin an eine feste Phase gebunden werden.

20 (i) *Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit Streptavidin*

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde jeweils 100 ng Streptavidin gegeben, gelöst in 200  $\mu\text{l}$  60 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6, und die Platte über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Streptavidin-Lösung in den Vertiefungen wurde entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20) gewaschen. Dann wurde in jede Vertiefung 250  $\mu\text{l}$  Assaypuffer  
 25 gegeben. Für den Assaypuffer wurde 5 g Casein in 100 ml 0,1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 L Volumen aufgefüllt. Die Lösung wurde eine Stunde gekocht, das Volumen mit destilliertem Wasser auf einen Liter ergänzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und 0,1 g Thimerosal zur Vermeidung von Mikrobenwachstum zugefügt. Die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit Assaypuffer inkubiert, dann der Assaypuffer entfernt und jede  
 30 Vertiefung fünfmal mit je 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen.

(ii) *Bindung von 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether*

Es wurde in eine jede Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  Biotin-Vitamin-D-Lösung gegeben (10 ng 25-OH-Vitamin-D-3 $\beta$ -3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether in 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer) und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln und unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Biotin-Vitamin-D-  
 35 Lösung aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Es folgte in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von Vitamin-D-bindenden Protein in Gegenwart von 25-OH-Vitamin-D aus Standard oder Probe.

(iii) *Probenvorbereitung*

Es wurde 50 µl Serum in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µl Ethanol<sub>abs</sub> (vorgekühlt auf -20°C) durch Vortexen gemischt und 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und die Überstände abgenommen und im ELISA eingesetzt.

Man kann in der Regel davon ausgehen, dass Plasma oder Serumproben bei 4°C etwa 2 Wochen stabil sind. Bei längerer Lagerung müssen sie bis zur Bestimmung tiefgefroren werden. Urinproben müssen vor einer Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 eingestellt werden. Sie können dann bei 4°C etwa 14 Tage aufbewahrt werden; bei längerer Lagerung müssen auch sie bis zur Bestimmung tiefgefroren werden.

(iv) *Kompetitive Bindung*

Es wurde jeweils 100 µl Vitamin-D-bindendes Protein, isoliert aus Ziegen Serum (1:15000 in Assaypuffer mit 3% (w/v) PEG 6000), zusammen mit 10 µl Standard, Kontrolle oder Probe (10 µl Überstand aus der Probenvorbereitung) in die Vertiefungen gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln und unter Rütteln inkubiert. Dann wurden die Lösungen aus den Vertiefungen entfernt und die Vertiefungen fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

(v) *Bestimmung der kompetitiven Bindung*

Es wurde jeweils 100 µl Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein (1:10000 verdünnt in Assaypuffer mit 3% (w/v) PEG 6000) in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde im Dunkeln und unter Rütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit 100 µl anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase (1:20 000 verdünnt in Waschpuffer). Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden Antikörper-Lösungen abgenommen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 100 µl Tetramethylbenzidin(TMB)-Substrat-Lösung (gebrauchsfertig von NOVUM Diagnostika GmbH, Dietzenbach, DE) in die Vertiefungen gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Farbentwicklung gestoppt durch Zugabe von 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Vertiefung. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Die nachstehenden Tabellen II und III zeigen das Pipettierschema für die Mikrotiterplatte sowie die Werte für die optische Dichten.

Als Standard wurden Lösungen von 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> in Assaypuffer mit folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/L (siehe Eichkurve in Fig. 5A). Als Kontrolle bzw. Proben dienten vier Seren von Patienten mit einer D-Hypovitaminose (Proben-Nrn. 24, 203, 963, 965) und sowie vier willkürlich ausgewählte Normalseren (Proben-Nrn. NP 18, NP 25, NP 34, NP 37 - Testreihen 3 und 4). Von den Vitamin-D-Mangelseren wurde zudem die 25-OH-Vitamin-D-Konzentration durch kompetitiven Bindungsassay mit Hilfe von <sup>3</sup>H-25-OH-Vitamin-D bestimmt. Als weitere "Kontrolle" dienten vier Lösungen, bei denen die jeweilige Konzentration an 25-OH-Vitamin-D aus anderweitigen Bestimmungen bekannt war, entweder aus den Herstellerangaben oder durch einen kompetitiven Bindungsassay (CBPA) mit <sup>3</sup>H-25-OH-Vitamin-D.

Tabelle II

Probenanordnung

Pipettier Schema	Standard nMol / L	Doppelwert von Spalte 1	Serumprobe Nr.	Doppelwert von Spalte 3	Kontrollen	Doppelwert von Spalte 5
Reihe / Spalte	1	2	3	4	5	6
A	NSB	NSB	24	24	K1 (CBPA)	K1 (CBPA)
B	0	0	203	203	K2 (CBPA)	K2 (CBPA)
C	8	8	963	963	K3 (HPLC)	K3 (HPLC)
D	20	20	965	965	K4 (HPLC)	K4 (HPLC)
E	50	50	NP 18	NP 18		
F	125	125	NP 25	NP 25		
G	312	312	NP 34	NP 34		
H			NP 37	NP 37		

5

NSB: Nichtspezifischer Bindungspuffer (Assaypuffer ohne Vitamin-D-Bindungsprotein)

Tabelle III

## Messwerte nach 30 Minuten Farbentwicklung

10

OD 450 nm	Standard	Doppelwert zu Spalte 1	Serumprobe Nr.	Doppelwert zu Spalte 3	Kontrollen	Doppelwert zu Spalte 5
Reihe / Spalte	1	2	3	4	5	6
A	---	---	0.947	1.023	1.903	2.300
B	2.256	2.182	0.853	0.910	0.393	0.371
C	1.845	1.861	0.646	0.637	1.674	1.586
D	1.432	1.456	1.429	1.303	0.578	0.634
E	0.625	0.612	0.524	0.547		
F	0.287	0.261	0.454	0.419		
G	0.156	0.176	0.341	0.368		
H	---	---	0.421	0.386		
B <sub>max</sub>	2.801	2.676				

Aus den Mittelwerten der Spalten 1 und 2 und den bekannten Konzentration an 25-OH-Vitamin-D wurde die in Fig. 5A gezeigt Eichkurve erstellt. Die Ordinate zeigt die optische Dichte als Mittelwert der beiden Messungen bei 450 nm; die Abszisse die Konzentration an 25-OH-Vitamin-D in nMol/l. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

15

**Beispiel 4: Vergleichende Bindungsanalyse mit <sup>3</sup>H-25-OH-Vitamin-D als kompetitiver Partner**

Soweit nicht anders angegeben ist, waren alle Reagenzien Puffer und Materialien gleich wie im vorgenannten Beispiel 3. Als kompetitiver Bindungspartner (Tracer) diente Tritium-markiertes 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>.

20

Abweichend zu Beispiel 3 wurden die Messproben durch Extraktion (in Einzelwerten) aufgereinigt. Hierzu wurde jeweils 50 µl Probe [nicht-spezifischer Assaypuffer NSB, Standard, Kontrolle, Patientenprobe (Plasma, Serum oder Urin)] in ein 1.5 ml Einmalreaktionsgefäß gegeben, 200 µl Acetonitril hinzugefügt, gemischt, die Gefäßwände freizentrifugiert, und die Mischung 20 bis 30



Minuten bei 4°C inkubiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 1700 x g zentrifugiert. Die Bestimmungen erfolgten in Doppelwerten mit den Überständen.

Hierzu wurde 25 µl klarer Überstand in ein Glasröhrchen (oder in ein Spezial-RIA-Gefäß von Sarstedt, Darmstadt) überführt, und 10 µl Tracer (<sup>3</sup>H-25-OH-D), 300 µl Assaypuffer und 100 µl Vitamin-D-bindendes Protein (nicht in NSB) hinzugeben. Der Röhrcheninhalt wurde gemischt, eine Stunde bei 4°C inkubiert, und zum Entfernen von nicht gebundenem radioaktiven Tracer 100 µl Aktivkohlesuspension (aktivkohlehaltiger Phosphatpuffer mit 0,1% NaN<sub>3</sub>) zugegeben. Der Röhrcheninhalt wurde gemischt, 3 bis 5 Minuten bei 4°C inkubiert, und die Aktivkohle durch 10 Minuten Zentrifugieren bei 1700 x g pelletiert. Es wurde dann jeweils 400 µl Überstand in ein Zählgefäß (7 ml) überführt und nach Zugabe von 2 ml Szintillatorflüssigkeit wie Aquasafe™ 300 oder HiSafe™ III die im Überstand befindliche Radioaktivität gezählt (2 Minuten in einem Beta-Counter). Die Messwerte für die Kontrollen nach Erstellung der Eichkurve sind in Tabelle 5 gezeigt.

Der Vergleich mit dem ELISA nach Beispiel 3 zeigt, dass für beide Assayverfahren (ELISA und CBPA) gilt, dass der Normbereich für 25-OH-Vitamin-D im Plasma oder Serum etwa 25 - 125 nmol/l ist. Die Nachweisgrenze dieser Testsysteme wurde festgesetzt als B<sub>0</sub> + 2SD. Sie beträgt etwa 2,5 nmol/l.

Kreuzreaktionen: Zu Aktivkohle behandeltem Serum wurde 25-OH-Vitamin-D<sub>2</sub> (125 nmol/l), 24,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> (250 nmol/l) und 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> (250 nmol/l) zugesetzt. Das 25-OH-Vitamin-D<sub>2</sub> reagierte zu 60%, das 24,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> zu 100% kreuz, während das 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> keine Kreuzreaktivität zeigte. Ähnliche Ergebnisse werden auch für erfindungsgemäße multifunktionelle 25-OH-Vitamin-D-Konjugate gefunden bzw. erwartet.

Reproduzierbarkeit: In Wiederholungsmessungen (n=11) einer 25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>-haltigen Probe wurden nachstehende Resultate erzielt. Ähnliches gilt auch für Messungen mit Hilfe der multifunktionellen 25-OH-Vitamin-D-Konjugate gemäß der Erfindung:

Tabelle IV

Intraassayvarianz:

	Anzahl	Mittelwert nmol/l	VK %
Probe 1	32	11,3	12,5
Probe 2	32	318	7,2

Interassayvarianz

	Anzahl	Mittelwert nmol/l	VK %
Probe 1	9	9,9	17
Probe 2	9	310	11

## Klinik:

	Anzahl	Mittelwert nmol/l
Normalpersonen	35	54
Patienten mit Schenkelhalsbrüchen	43	9,5

Für die in Beispiel 3 genannten Proben wurden mit den Verfahren nach Beispiel 3 und 4 folgende 25-OH-Vitamin-D-Konzentrationen ermittelt.

5

Tabelle V

Serumproben Nr.	ELISA mit 25-OH-D- Biotin nMol / L	CBPA mit <sup>3</sup> H-25-OH- D nMol / L		Kontrollen	ELISA mit 25-OH-D- Biotin nMol / L	Alternative Bestimmung nMol / L
24	32.9	33.3		K1	Fehlwert	20 (a)
203	36.8	29.19		K2	76.8	75-125 (a)
963	48.9	38.4		K3	15.0	20-33 (b)
965	21.8	15.8		K4	51.3	72-120 (b)
NP 18	57.0					
NP 25	67.9		(a) CBPA mit <sup>3</sup> H-25-OH-D			
NP 34	82.4		(b) Herstellerangabe			
NP 37	72.9					

Die von den Herstellern angegebenen Werte waren generell höher als die im kompetitiven Bindungsassay ermittelten Konzentrationen. Dies lässt vermuten, dass sich in den überlassenen Proben bereits ein erheblicher Teile des 25-OH-Vitamin-D zersetzt bzw. durch Lichteinwirkung umgelagert hatte.

## Beispiel 5: Kontrolle der ELISA-Bestimmung durch HPLC

Es wurden daher in verschiedenen Proben die 25-OH-Vitamin-D-Konzentration durch ELISA gemäß Beispiel 3 und zur Kontrolle durch HPLC nachbestimmt. Für die Eichkurve wurden Standards verwendet mit Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/l. Alle Proben und Standards wurden in Doppelwerten bestimmt. Die 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration der Proben wurde dann anhand der Eichkurve aus den Mittel der Doppelwerte berechnet.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle VI gezeigt.

20

Tabelle VI

Probe	25-OH-Vitamin-D <sub>3</sub> [nMol/L]	
	HPLC	ELISA
1	20-33	30
2	72-120	76
3	79-102	96
4	< 15	< Nachweisgrenze
5	< 15	7.4

**Beispiel 6: Langzeitstabilität von 25-Hydroxyvitamin-D-Konjugat in der ELISA-Bestimmung.**

- Es wurden Eichkurven mit gleichen Standardlösungen und Reagenzien gemäß dem Beispiel 3 nach 60 und 100 Tagen wiederholt, um zu ermitteln, inwieweit sich eine ELISA-Bestimmung mit erfindungsgemäßen Biotin-25-OH-Vitamin-D-Konjugat im Laufe der Zeit verändert, wenn die Reagenzien zwischenzeitlich bei 4 bis 6°C im Dunkeln gelagert werden. Die nachstehende Tabelle zeigt die jeweiligen optischen Dichten nach 30 Minuten Entwicklung (siehe Beispiel 3)

Tabelle VII

Standard	Standard	Doppelwert zu Spalte 1	Nach 60 Tagen	Doppelwert zu Spalte 3	Nach 100 Tagen	Doppelwert zu Spalte 5
nMol/L	1	2	3	4	5	6
NSB	---	---	0.191	0.280	0.088	0.109
0	2.256	2.182	2.227	2.285	1.471	1.562
8	1.845	1.861	2.041	2.125	1.345	1.366
20	1.432	1.456	1.860	1.903	1.079	1.060
50	0.625	0.612	1.293	1.214	0.610	0.690
125	0.287	0.261	0.606	0.615	0.442	0.329
312	0.156	0.176	0.448	0.434	0.293	0.257

- Werden die Werte der verschiedenen Eichkurven, abzüglich der jeweiligen nichtspezifischen Bindung, in ein Diagramm aufgetragen (siehe Fig. 5B), so ist leicht ersichtlich, dass die Eichkurven abgesehen einer relativen vertikalen Verschiebung die gleiche Form besitzen. Dies zeigt, dass sich die Empfindlichkeit und Spezifität der ELISA-Bestimmungen über den genannten Zeitraum nicht verändert hat.

**Beispiel 7: 25(OH)-Vitamin-D<sub>3</sub>-ELISA-MTP mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein**

- Der Versuch erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Beispiel 3 und dem in Fig. 4 gezeigten Prinzip. Es wurden folgende Puffer verwendet: a) Waschpuffer: PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20; b) Assaypuffer: 5 g Casein wurden in 100 ml 0.1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 l aufgefüllt. Dann wurden 3% (w/v) PEG-6000 sowie 0.1 g Thimerosal™ hinzugefügt. Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln und unter Schütteln.

*(i) Beschichtung der Mikrotiterplatte*

- In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein in 60 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6 gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Lösungen wurden entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurde 250 µl Assaypuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Assaypuffer wurde entfernt und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

5 (ii) *Probenvorbereitung*

Es wurde 50 µl Serum, Plasma oder Standard in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µl Ethanol<sub>abs</sub> (vorgekühlt auf -20 °C) gemischt, gevortext und dann 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im ELISA eingesetzt.

10 (iii) *ELISA*

Als Erstes wurde in eine jede Vertiefung 100 µl Vitamin-D-Bindungsprotein, verdünnt in Assaypuffer, gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Platte ausgeschlagen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Danach wurden je 100 µl Biotin-Vitamin-D, verdünnt in Assaypuffer, zusammen mit 10µl  
15 Standard, Probe oder Kontrolle in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Lösungen wurden wiederum entfernt und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Als Drittes wurde jeweils 100 µl Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin einer 1:10000-Verdünnung in Waschpuffer in die Vertiefungen gegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur  
20 inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Für die Farbreaktion wurden 100 µl TMB-Substrat-Lösung in jede Vertiefung gegeben. Nach ausreichender Farbentwicklung (30 Minuten) wurde die Reaktion mit 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro  
25 Vertiefung beendet. Die Messungen der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Es wurden ähnliche bis gleiche Ergebnisse erhalten, wie in Beispiel 3 bzw. Tabelle V.

**Beispiel 8: Inhalt einer Testpackung bzw. eines Reagenziensatzes zur Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin-D und 1α,25-Dihydroxyvitamin-D:**

Inhalt der Testpackung bzw. Testreagenzien und deren Vorbereitung:

Standards, bspw. 6 Fläschchen 25-OH-Vitamin-D-Standards mit den Konzentrationen 0, 8, 20, 50,  
30 125 und 312 nmol/l; gebrauchsfertig in Waschpuffer.

Mikrotiterplatten, bspw. mit Streptavidin beschichtet, steril verpackt und vorgewaschen.

Pufferlösungen, bspw. Waschpuffer, NSB-Puffer und Assaypuffer, Stopplösung.

Kontrollen, bspw. zwei Fläschchen 25-OH-Vitamin-D-Kontrollen in Humanserum. Kontrolle 1 (30 nMol 25-OH-D/L), Kontrolle 2 (80 nMol 25-OH-D/L).

35 Tracer, bspw. ein Fläschchen mit Biotin-Vitamin-D (25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub>-3β-3'[6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether) in Waschpuffer (100 ng/ml)

Vitamin-D-Bindungsprotein, bspw. ein Fläschchen mit Bindungsprotein aus Ziegenserum in Phosphatpuffer mit 0,1% NaN<sub>3</sub> als Stabilisator.

**Marker**, bspw. ein Fläschchen anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase in Waschpuffer.

**TMB-Entwicklerlösung**, bspw. ein Fläschchen stabilisierte Tetramethylbenzidin-Entwicklerlösung in Waschpuffer.

**Beispiel 9: ELISA zur quantitativen Bestimmung von 1,25-Dihydroxyvitamin-D**

5 Die Bestimmung von 1,25-Vitamin-D<sub>3</sub> erfolgte nach dem in Fig. 2 dargestellten Prinzip, nur dass als Tracer 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>-Biotin-Verbindung diente. Bei der Konkurrenz wird 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> aus Standard oder Probe zusammen mit einem 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Bindungsprotein, einem monoklonalen Maus-anti-1,25-Dihydroxyvitamin-D-Antikörper (B. Mawer et al. in Steroids, 1985, 46, 741-754), zusammengegeben. Das 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> aus Standard  
10 oder Probe und die immobilisierte 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Biotin-Verbindung konkurrieren dann um die Bindungsstelle des Antikörpers. Der Nachweis erfolgt mittels Peroxidase-markierten Antikörpern (Ziege-anti-Maus-IgG-POX).

(i) Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Streptavidin erfolgte wie in Beispiel 3, wobei aber der Waschpuffer 0.1% Triton™ X-100 als Detergens enthielt. Anders als in Beispiel 3 wurden die  
15 Vertiefungen der Mikrotiterplatte nach der Behandlung mit der Streptavidin-Lösung nicht mehr mit Waschpuffer gewaschen, sondern jeweils eine Stunde mit 250 µl wässriger Sorbitol-Lösung (Karion™ F 1:4 in Wasser) behandelt. Die Bindung des Tracers (1,25-Dihydroxyvitamin-D-Biotin) erfolgte wie in Beispiel 3, nur dass in jede Vertiefung 200 µl Tracer-Lösung gegeben wurde (20 ng 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-3β-3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether in Waschpuffer). Das 1,25-Dihydroxy-  
20 vitamin-D-Biotin wurde wie in Fig. 1 schematisch aufgezeigt synthetisiert, nur dass nach dem ersten Schritt die im Überschuss 3-cyanoethylierte 1-OH-Vitamin-D-Zwischenverbindung isoliert wurde. Es kann aber auch beliebig eine der nachfolgenden Zwischenverbindungen bzw. nach einer Mischsynthese spezifisch der 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-3β-3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether mittels HPLC isoliert werden.

25 (ii) Da im menschlichen Serum das Verhältnis von 25-OH-Vitamin-D<sub>3</sub> zu 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> in der Regel im Bereich von 1000:1 liegt, bedarf die quantitative Bestimmung von 1,25-Dihydroxyvitamin-D einer gründlichen Vorbereitung der Proben durch eine kombinierte Verteilungs- und Adsorptionschromatographie. Im ersten Schritt wurden hierzu Extrelut™-Kieselgur-Säulen (Merck, Darmstadt) mit je 500 µl Tris-Puffer äquilibriert und dann auf die Säulen jeweils 500 µl  
30 Standard, Kontrolle oder Untersuchungsprobe - in Duplikaten - aufgetragen; die Proben konnten dann 10 Minuten auf den Säulen einziehen. Die Abtrennung der Vitamin-D-Verbindungen von der Extrelut™-Säule erfolgte durch 4 mal 1 ml Diisopropylether im Abstand von jeweils drei Minuten. Der Extrelut™-Extrakt wurde unmittelbar auf eine Silica-Kartusche (Merck, Darmstadt) überführt und die Extrelut™-Säule verworfen. Die Silicasäule wurde 5 mal mit 2 ml Isopropanol/Hexan (4/96 v/v) und 3  
35 mal mit 2 ml Isopropanol/Hexan (6/94 (v/v)) gewaschen. Das 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D wurde dann mit 2 mal 2 ml Isopropanol/Hexan (25/75 v/v) von der Silicasäule eluiert und unter Stickstoffstrom bei 37°C oder in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Standard- und Untersuchungsproben wurden schließlich in 20 µl Ethanol p.a. aufgenommen, mit je 200 µl Maus-anti-1,25-Dihydroxyvitamin-D-Antikörperlösung (1: 150000 in RRA-Assaypuffer: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM KCl, 1,25 mM EDTA,

3mM Mercaptoethanol, pH 7,5) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert – möglichst zeitgleich mit der Belegung der Streptavidin-behandelten Mikrotiterplatte mit dem 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Biotin-Tracer.

- (iii) Die Vertiefungen der Tracer-beschichteten Mikrotiterplatte wurden 5 mal mit je 300 µl Triton™-Waschpuffer gewaschen und auf saugfähigem Papier ausgeschlagen. Dann wurde 200 µl Antikörper-Probenlösung aus der Vorinkubation in die Vertiefungen überführt und eine Stunde im Dunkeln und unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösungen aus den Vertiefungen wurden diese fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die quantitative Bestimmung erfolgte analog Beispiel 3 durch eine Stunde Inkubation mit 200 µl Kaninchen-anti-Maus-IgG-Peroxidase (1:10000 in Waschpuffer) bei Raumtemperatur, fünfmal Waschen der Vertiefungen mit 300 µl Waschpuffer, eine Farbreaktion im Dunkeln mit 200 µl TMB-Substratlösung (gebrauchsfertig von NOVUM Diagnostika GmbH, Dietzenbach), Stoppen der Farbreaktion nach 15 Minuten durch Zugabe von 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Bestimmen der Extinktion bei 450 nm.

- Die nachstehende Tabelle VIII zeigt die Ergebnisse der 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Bestimmung im Serum von 11 Dialysepatienten und sechs willkürlich ausgewählten Normalpersonen. Zur Ermittlung der Eichkurve bzw. als Standard wurden Lösungen von 1,25-Dihydroxyvitamin-D in Assaypuffer mit folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 6,6, 20, 60 und 180 pg/ml (siehe Eichkurve in Fig. 5C).

Tabelle VIII

Pipettier Schema	Standard 1,25-OH-Vit.D [pg/ml]	Anmerkungen	OD 450 nm	Doppelwert	Mittelwert	Standard-Abweichung
1	0	Eichkurve Siehe Fig. 5C	0,784	0,781	0,782	0,002
2	6,6		0,732	0,741	0,737	0,006
3	20		0,628		0,628	
4	60		0,484		0,484	
5	180		0,233		0,233	
Kontroll-Serum 98-08-295	50,1	Sollbereich: 23-63 pg/ml  Mittel: 43,21 pg/ml S.D.: 6,62 pg/ml	0,493			
Proben-Nummer	Messwert [pg/ml]					
1	6,5	Serumproben von Dialysepatienten  Mittelwert: 20,5 S.D. 17,2 Median 13,4	0,705	0,733	0,719	0,020
2	39,1		0,564	0,508	0,536	0,040
3	57,8		0,475	0,458	0,466	0,012
4	12,2		0,672	0,687	0,679	0,010
5	0,3		0,776	0,774	0,775	0,002
6	4,0		0,667	0,816	0,741	0,105
7	13,4		0,642	0,700	0,671	0,041
8	39,4		0,565	0,504	0,535	0,043
9	22,1		0,619	0,618	0,000	
10	22,6		0,531	0,700	0,616	0,119
11	8,6		0,705		0,705	
Vergleichs-proben						
1	52,9	Serumproben von Normalpersonen  Mittelwert 46,0 S.D. 9,7 Median 47,8	0,502	0,464	0,483	0,027
2	42,6		0,518	0,525	0,522	0,005
3	35,3		0,522	0,583	0,553	0,043
4	32,9		0,571	0,556	0,563	0,010
5	59,2		0,410	0,514	0,462	0,073
6	53,1		0,485	0,480	0,482	0,003

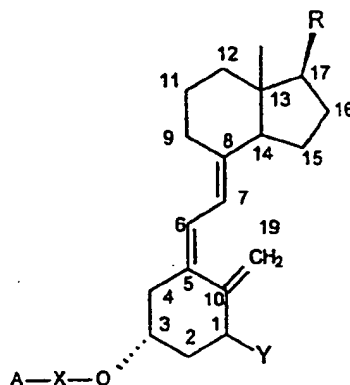
- 5 Fig. 14 veranschaulicht in einem Balkendiagramm nochmals die gefundenen Werte für Dialyse- und Normalpatienten, wonach das Serum von Dialysepatienten im Schnitt deutlich weniger aktives 1,25-Dihydroxyvitamin-D enthält. Die große Varianz der Werte bei den Dialysepatienten zeigt zudem die Notwendigkeit, bei Dialysepatienten den Gehalt an aktiviertem 1,25-Dihydroxyvitamin-D im Serum noch verstärkt zu kontrollieren, um den typischen Folgen eines Vitamin-D-
- 10 Mangels besser entgegenzutreten zu können.

## PATENTANSPRÜCHE

## 1. Vitamin-D-Derivat der Formel:

5

10



(I)

15

worin ist:

- O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe;  
 X eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoffgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, die übliche Heteroatome wie S, O, N oder P aufweisen kann  
 Y Wasserstoff oder Hydroxy;  
 A eine Tracer-Gruppe, die von einem bindenden Protein mit hoher Affinität gebunden werden kann;  
 R eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoff-Seitengruppe von Vitamin-D oder eines Vitamin-D-Metabolits, eine Seitengruppe von Vitamin-D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub>, die 25-OH-Seitengruppe von Vitamin-D<sub>2</sub> oder -D<sub>3</sub>.

25

2. Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1, wobei A ausgewählt ist aus Biotin, Digoxigenin, Tyrosin, FITC substituiertem Tyrosin, substituierten Aminosäuren, charakteristischen Aminosäure- und Peptidsequenzen, FITC, Proteinen und Peptidgruppen, Protein A, Protein G, Vitamin-D-Derivaten, 25-OH-Vitamin-D.
3. Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1, wobei A eine Verbindung ist der Formel (I), welche in der 3 $\beta$ -Stellung über eine Etherbrücke mit der Abstandsgruppe X verbunden ist.
4. Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 3, wobei die Abstandsgruppe eine Länge von 0,8 bis 2 nm, besonders bevorzugt 0,9 bis 1,5 nm.
5. Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 4, wobei die Abstandsgruppe eine Aminocarbonsäure-, ein Aminoundecansäure- oder ein Aminopolyetherrest ist.

35



6. Verfahren zur Herstellung eines Vitamin-D-Derivats nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5, umfassend die Schritte: a) Cyanoethylierung von 25-Hydroxyvitamin-D mit Acrylnitril in einem Gemisch mit Acetonitril, Kaliumhydrid und tert-Butanol und b) Reduktion der Nitrilgruppe mit LiH/LiAlH<sub>4</sub>.
- 5 7. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metabolit in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5 als Bindungspartner eingesetzt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Verfahren eine Proteinbindungsanalyse umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Verfahren die Bindung an einen Rezeptor umfasst.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Verfahren eine Bindung an einen Antikörper umfasst.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verfahren ein kompetitiver Immunoassay ist, ausgewählt aus RIA, EIA/ELISA, LiA und FiA.
12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verfahren ein Sandwich-Immunoassay ist, ausgewählt aus IRMA, IEMA/EUA, ILMA (Immunolumineszenzassay) und IFMA (Immunofluoreszenzassay).
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, umfassend eine feste Phase, ausgewählt aus Mikrotiterplatte und anderen festen Trägern, Mikropartikel, bevorzugt aus Agarose, polymerem Material, Cellulose, magnetische Mikropartikel.
- 20 14. Verfahren nach einem Anspruch 7 bis 13, wobei das Verfahren automatisierbar in Flüssig- oder Festphase erfolgt.
15. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach irgendeinem Anspruch 7 bis 14, umfassend die Schritte: a) Beschichten eines festen Trägers mit Streptavidin; b) Zugabe von Biotin-Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5; c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D-bindendes Protein; d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten Antikörpern gegen Vitamin-D-bindendes Protein.
- 25 16. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach irgendeinem Anspruch 7 bis 14, umfassend die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit Antikörpern gegen Vitamin-D-bindendes Protein; b) Zugabe von Vitamin-D-bindendes Protein; c) Zugabe der Probe sowie einer definierten Menge Biotin-gekoppeltes Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1; d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin.
- 30

17. Verfahren nach irgendeinem Anspruch 7 bis 16, wobei die Bestimmung erfolgt durch Markierung mit einem Enzym, das eine Nachweisreaktion katalysiert.
18. Reagenziensatz zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach einem Verfahren gemäß irgendeinem Anspruch 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass er eine standardisierte Menge Feststoff oder Lösung eines Vitamin-D-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.
- 5

1/15

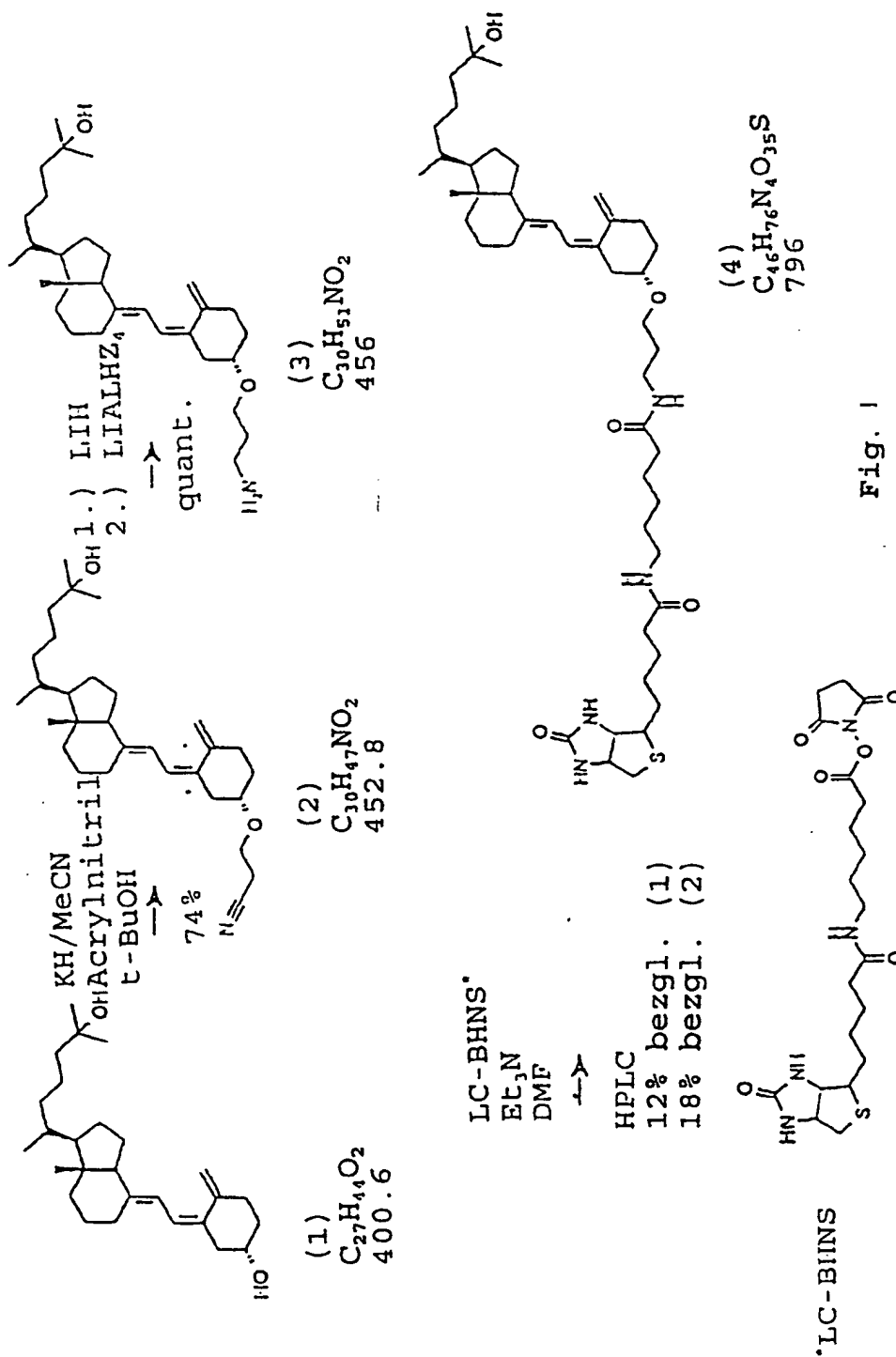


Fig. 1

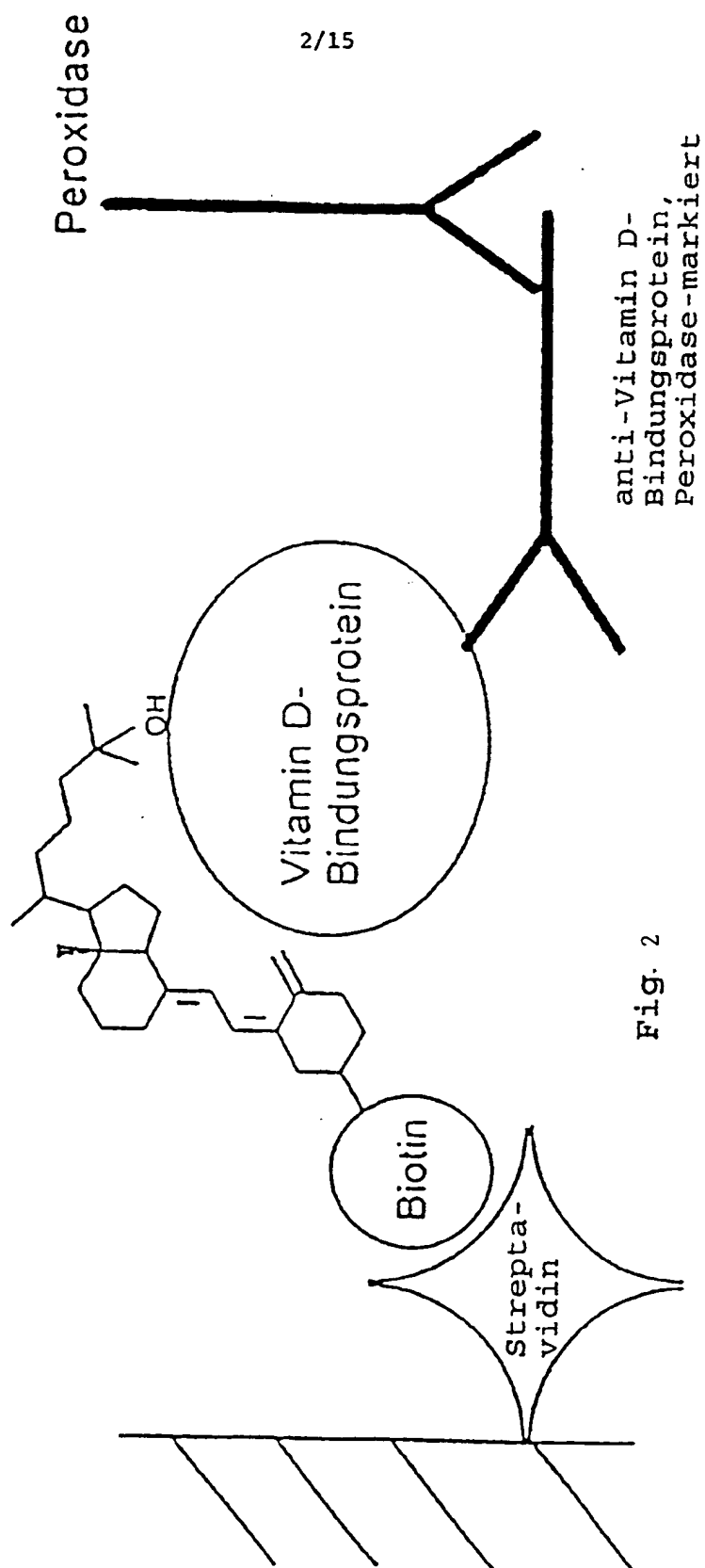


Fig. 2

3/15

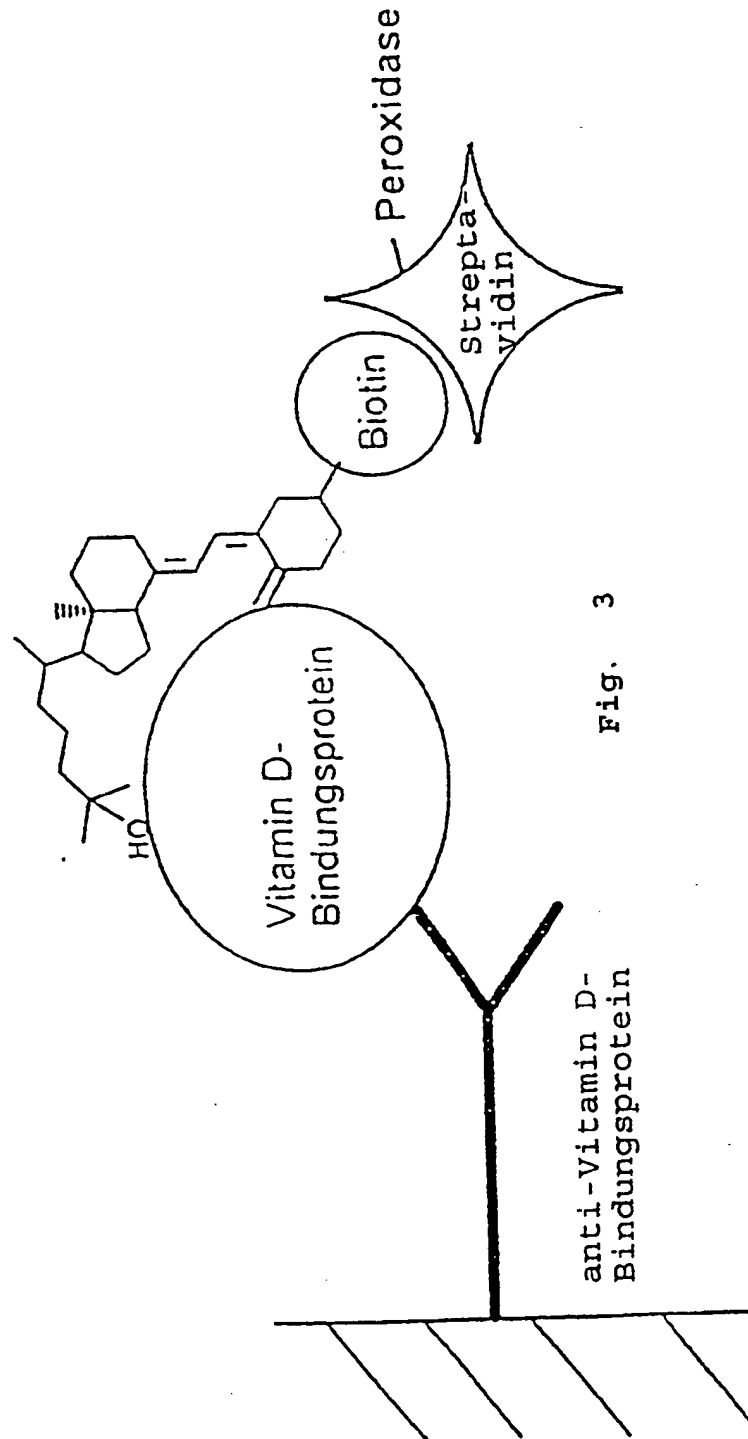


Fig. 3

4/15

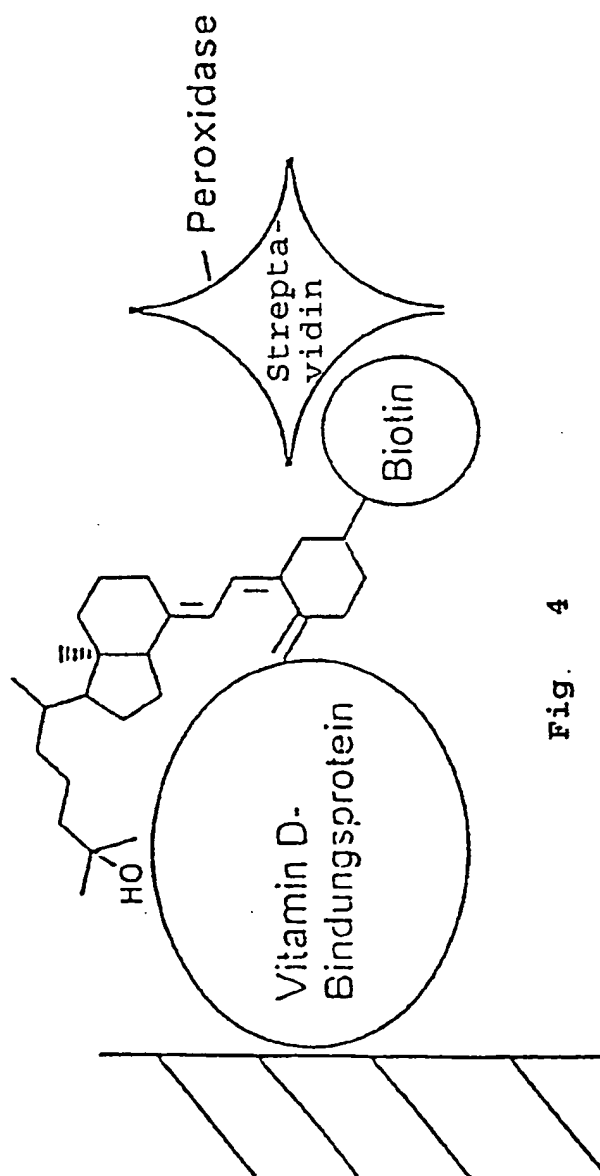
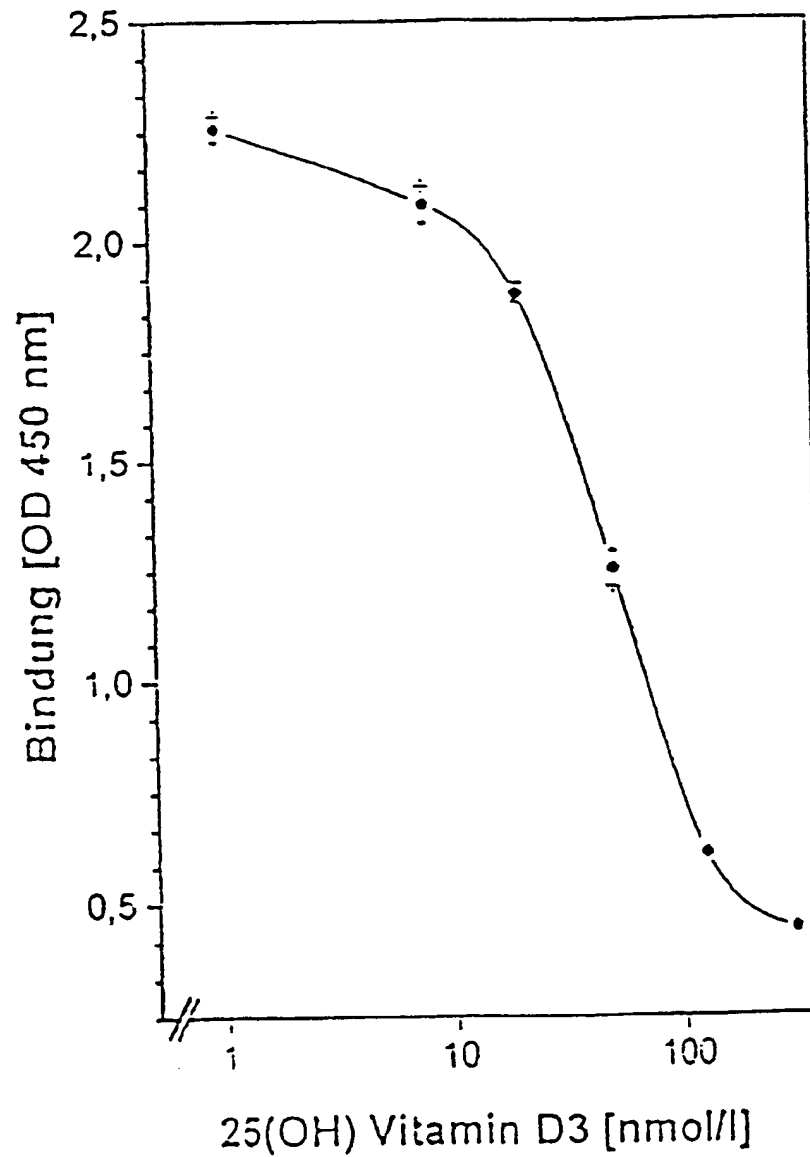


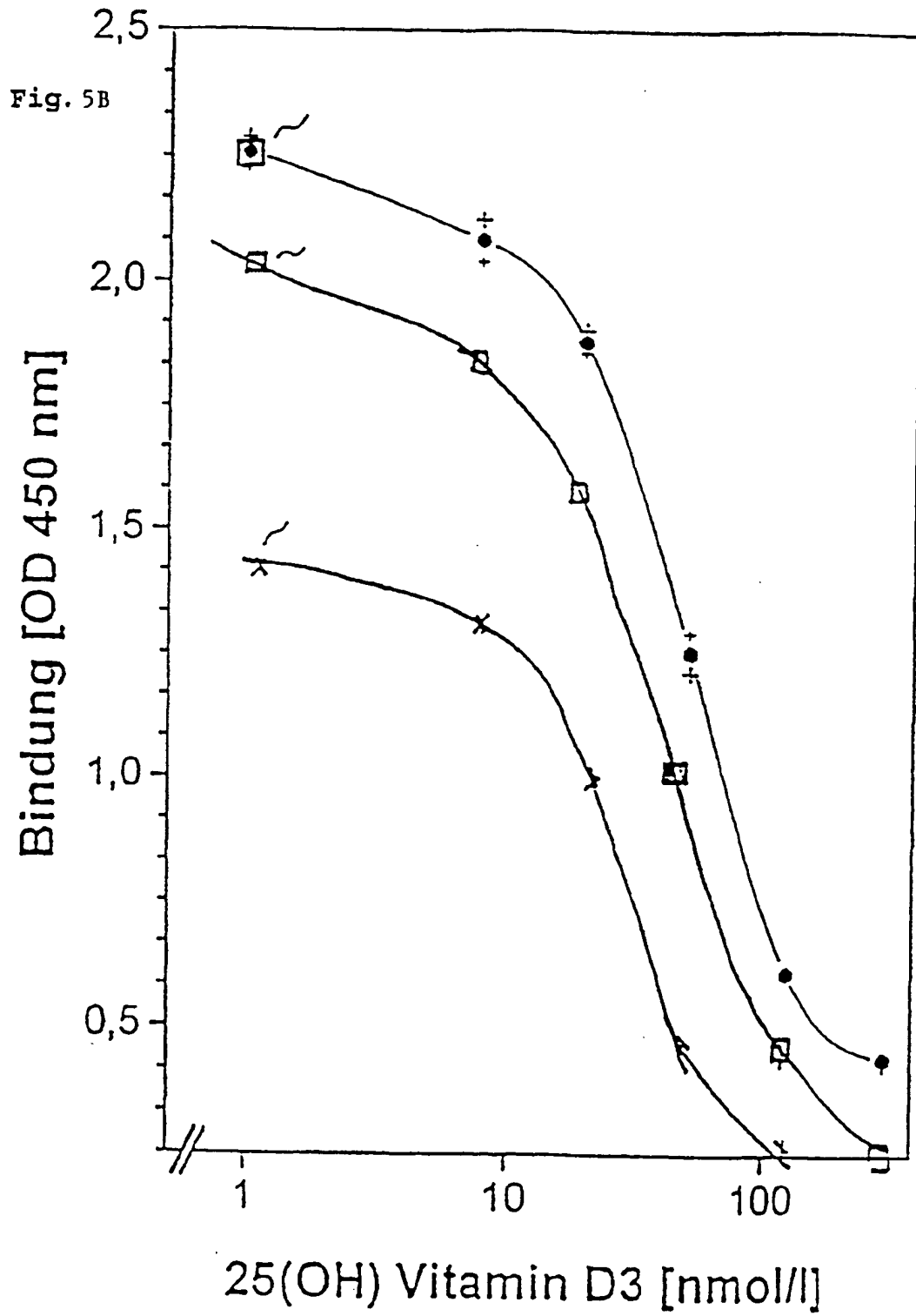
Fig. 4

5/15

Fig. 5A

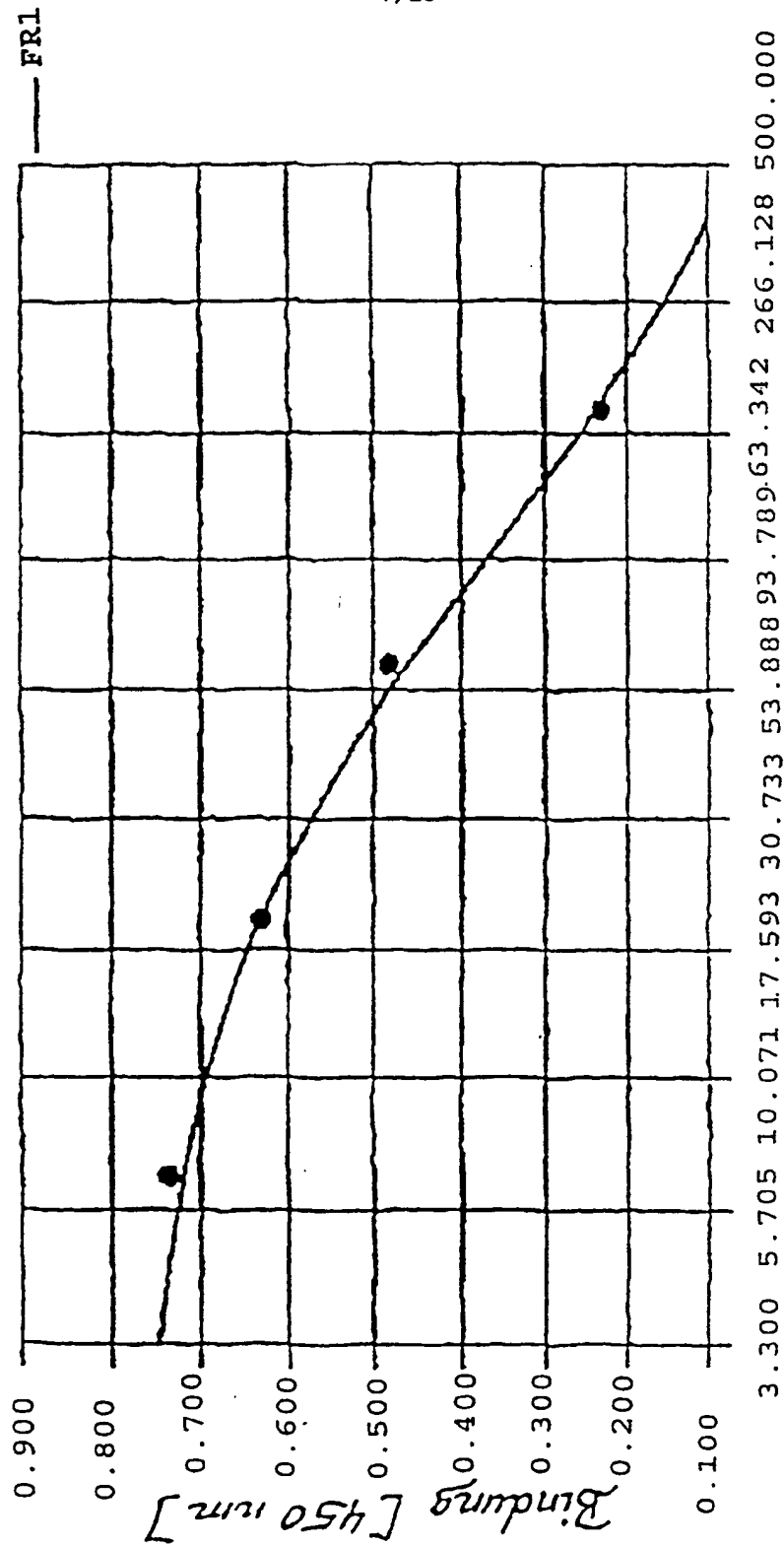


6/15





7/15



1,25 Dihydroxyvitamin D [pg/ml] Fig. 5c

8/15

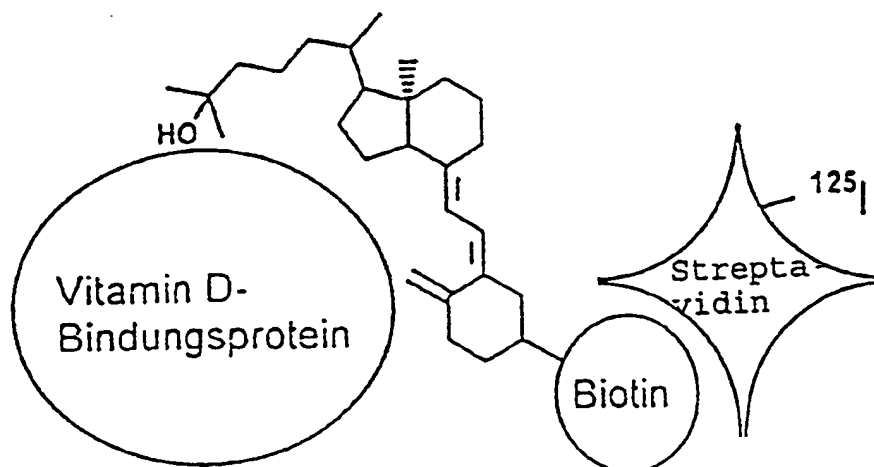


Fig. 6

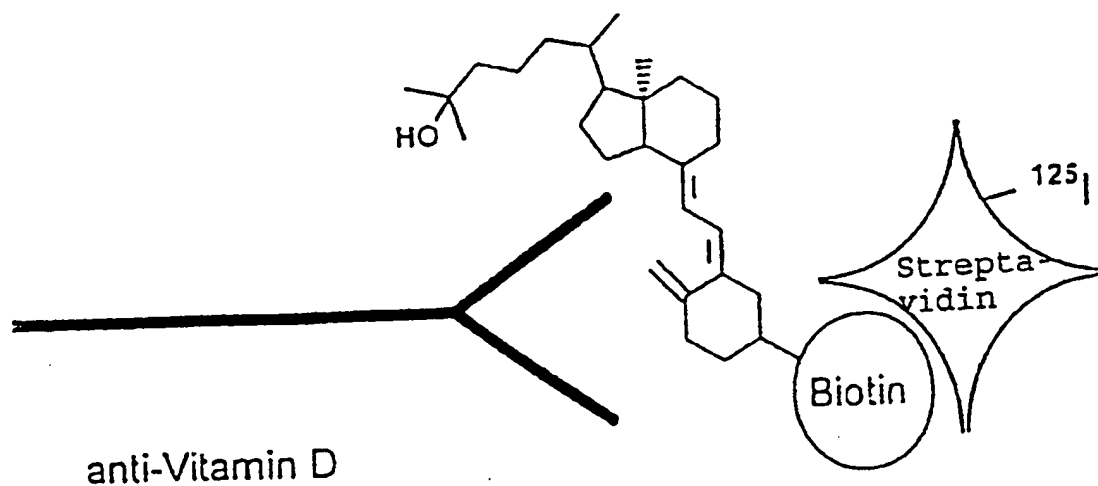


Fig. 7

9/15

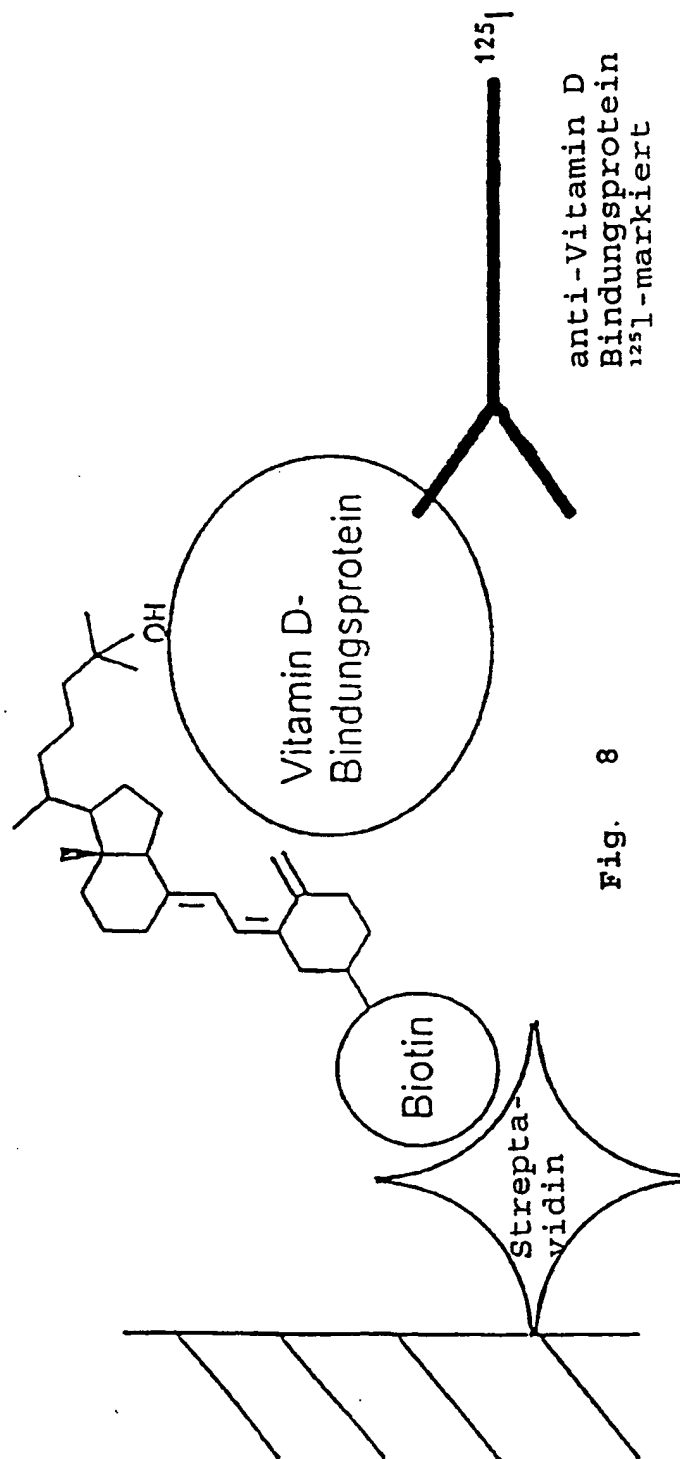


Fig. 8

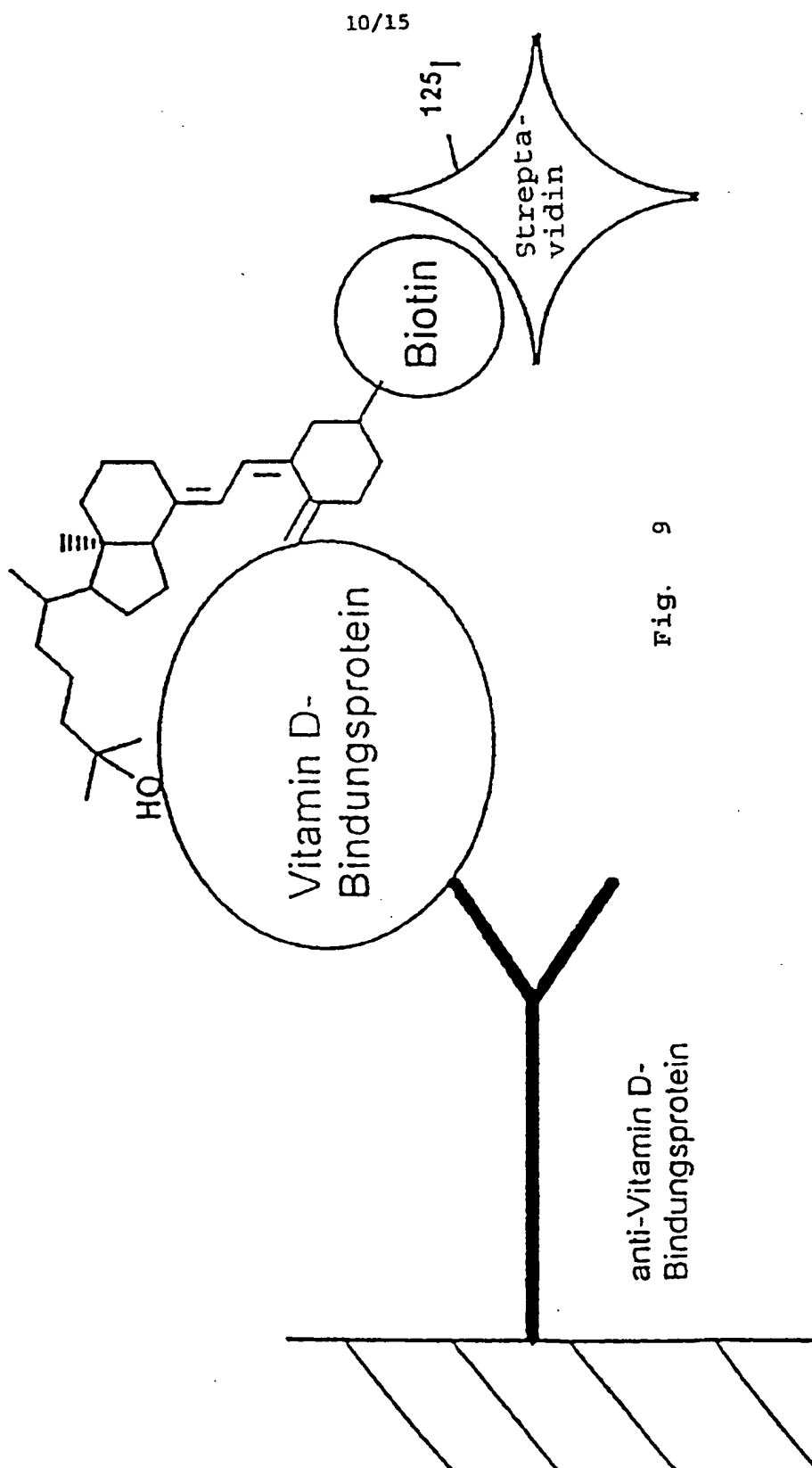


Fig. 9

11/15

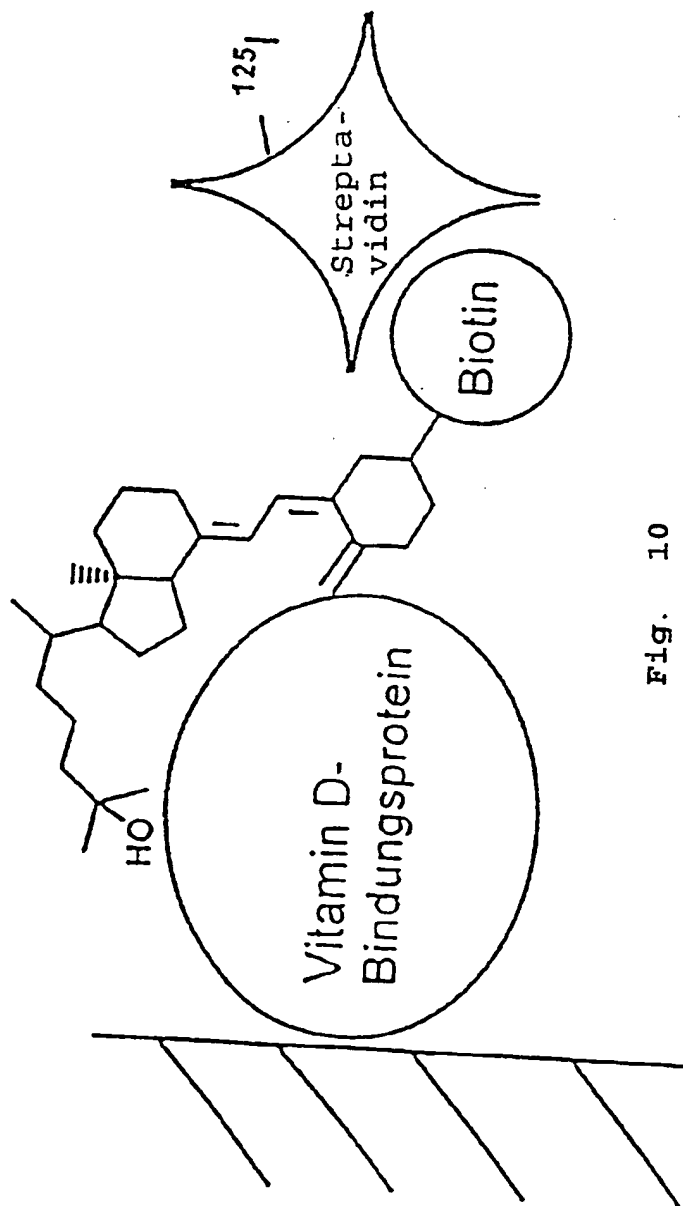


Fig. 10

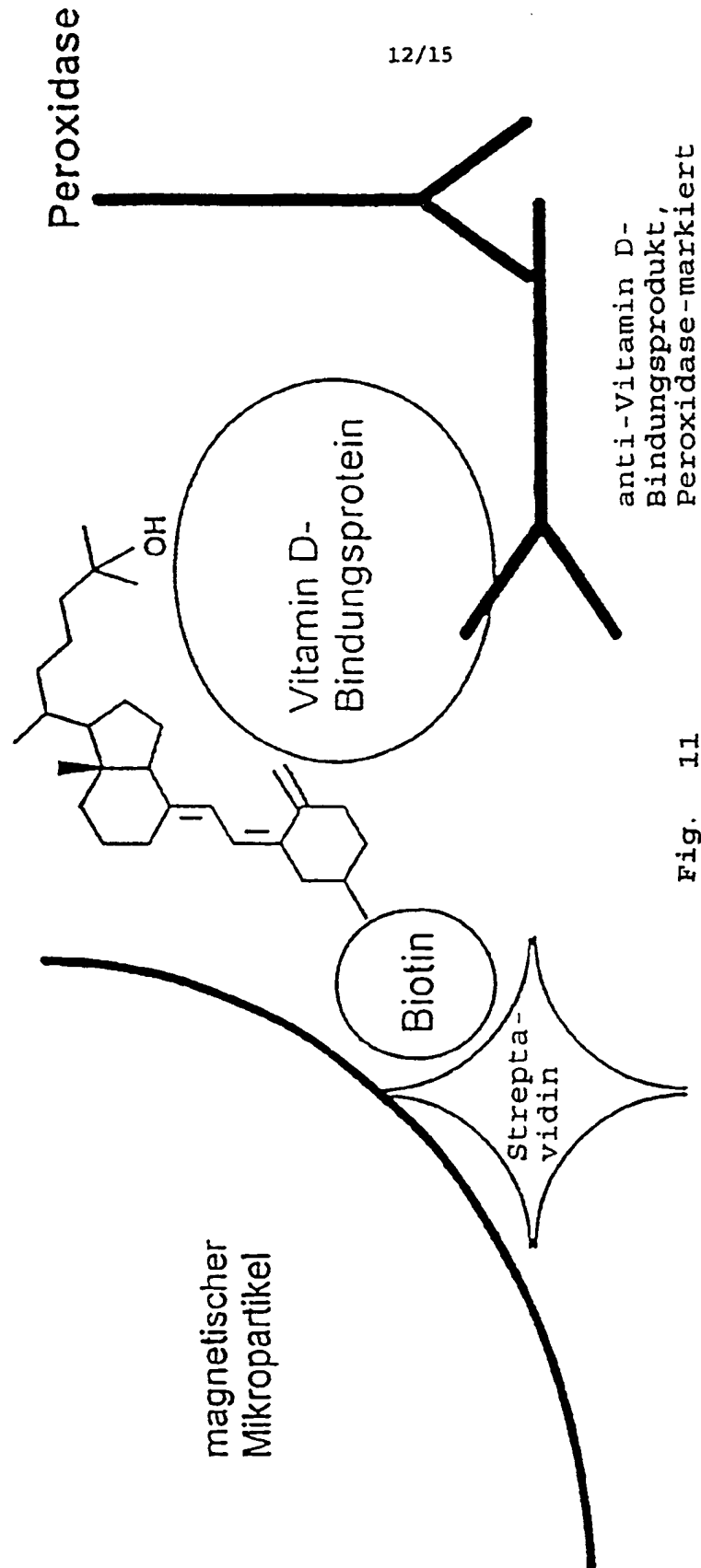


Fig. 11

13/15

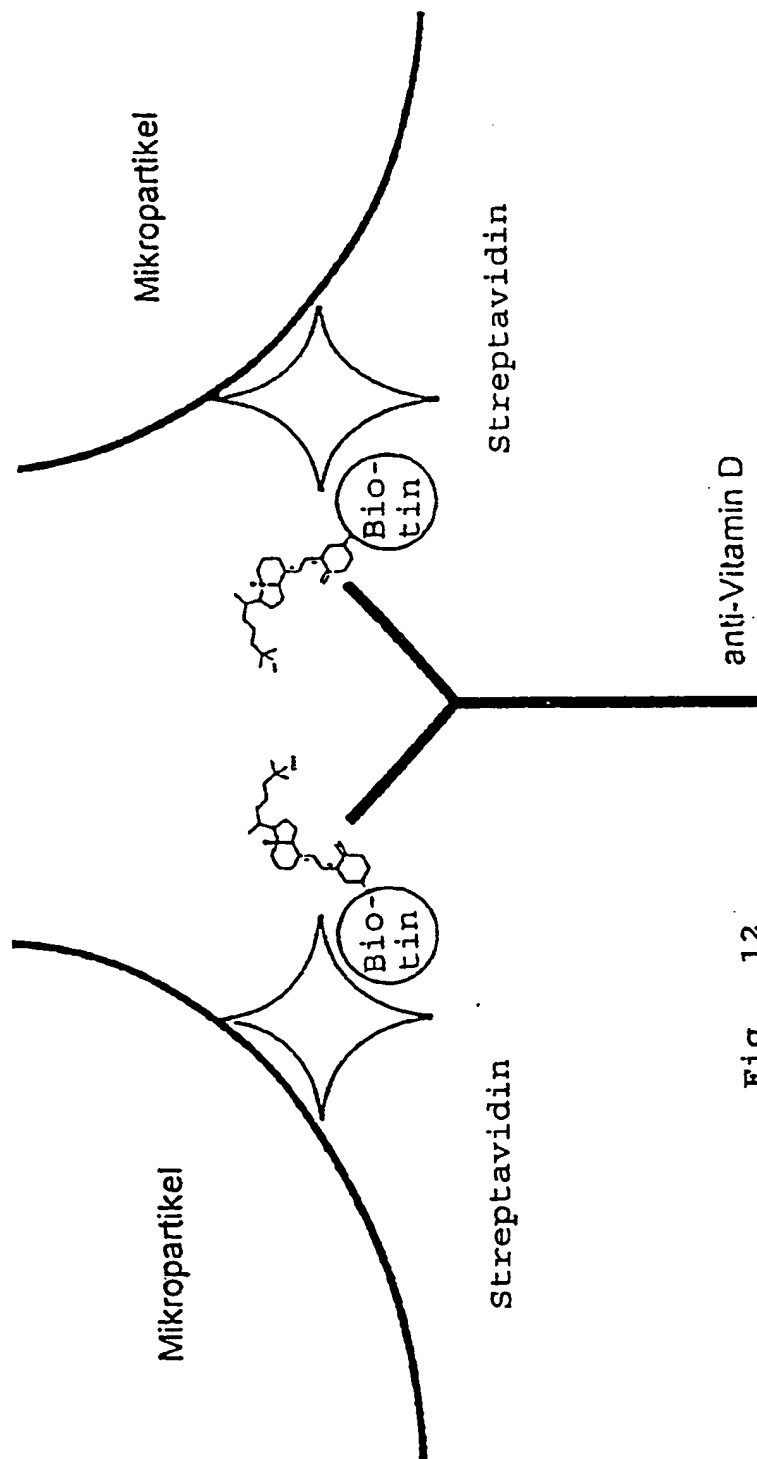


Fig. 12

14/15

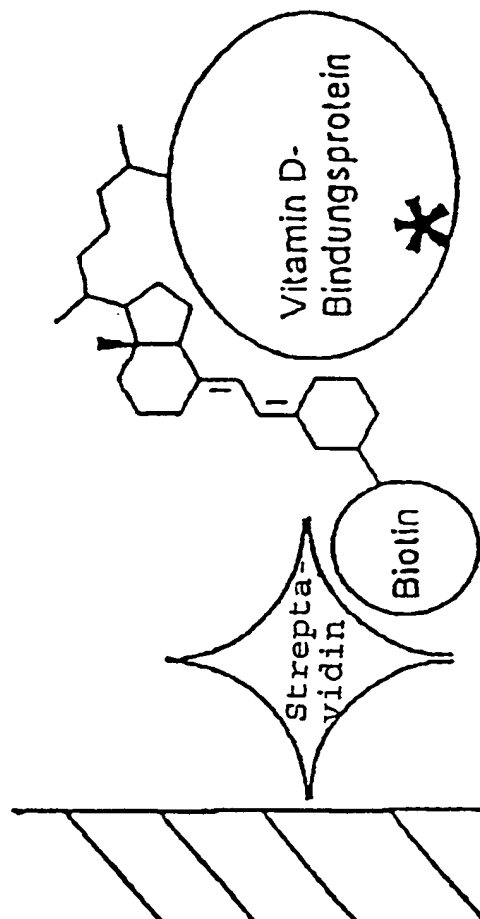


Fig. 13



15/15

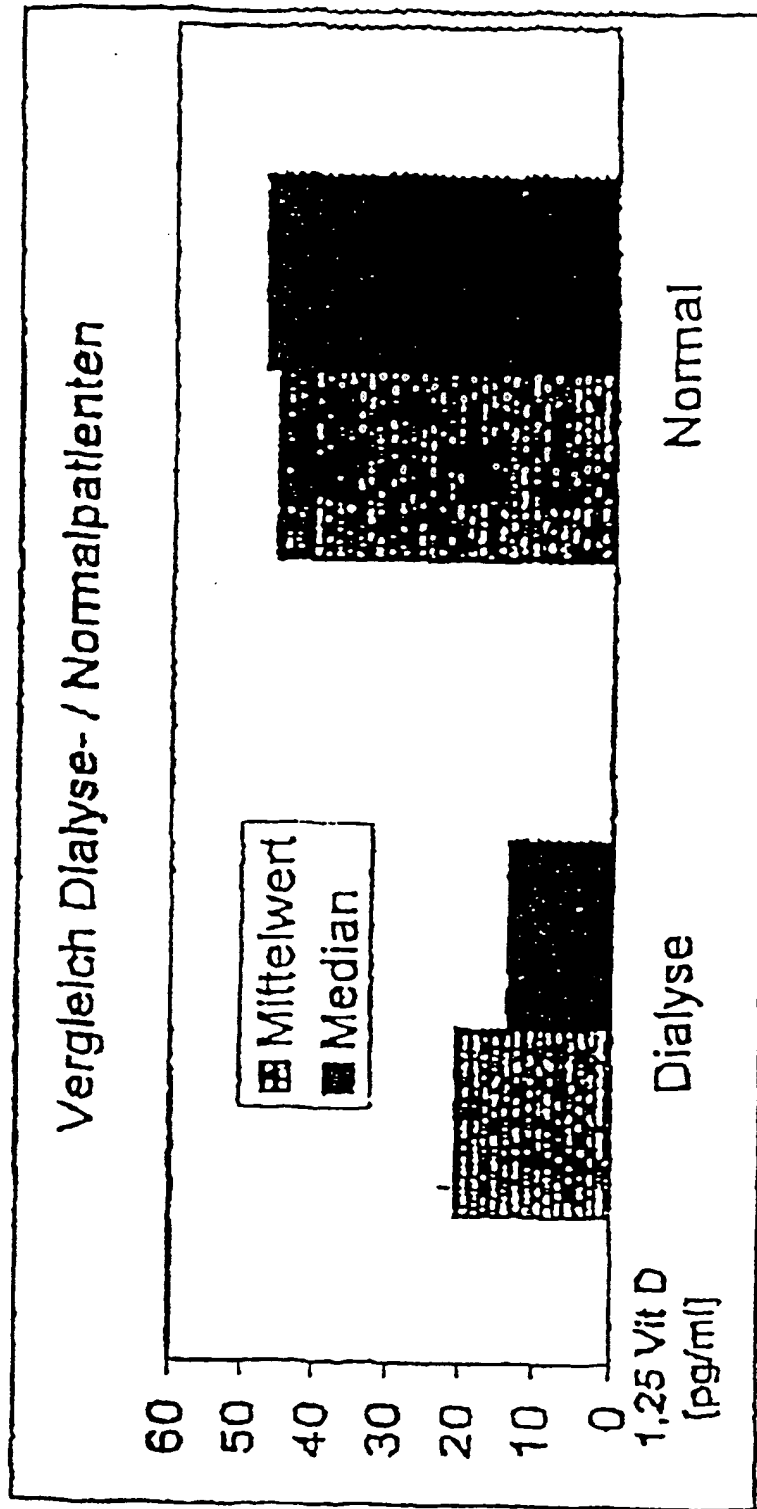


Fig. 14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 99/04418

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C07C401/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 24127 A (A AND D ASSAY INC ;RAY RAHUL (US); HOLICK MICHAEL F (US)) 10 July 1997 (1997-07-10) examples 1-3,5,9	1-18
X	KOBAYASHI, N. ET AL.: "Specificity of Polyclonal Antibodies Raised against a Novel 24,25-Dihydroxyvitamin D3-Bovine Serum Albumin Conjugant Linked through the C-11-alpha or C-3 Position" J. STEROID BIOCHEM. MOLEC. BIOL., vol. 62, no. 1, 1997, pages 79-87, XP002119849 page 82, column 1, line 1-30 --- -/-	1,2,5, 7-11,13, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 1999

Date of mailing of the international search report

10/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Janus, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/04418

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIGASHI, T. ET AL.: "Enzyme-linked immunosorbent assay for plasma 24,25-dihydroxyvitamin-D3" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 365, no. 1-3, 1998, pages 151-158, XP002119850 the whole document	1,2,5, 7-11,13, 18
A	EP 0 312 360 A (TOYO JOZO KK) 19 April 1989 (1989-04-19) cited in the application	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9724127 A	10-07-1997	AU 1429397 A	28-07-1997
		CA 2239617 A	10-07-1997
		EP 0873126 A	28-10-1998
EP 0312360 A	19-04-1989	JP 2000274 A	05-01-1990
		DE 3872153 A	23-07-1992
		US 5075465 A	24-12-1991
		US 5202266 A	13-04-1990

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04418

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C07C401/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 24127 A (A AND D ASSAY INC ;RAY RAHUL (US); HOLICK MICHAEL F (US)) 10. Juli 1997 (1997-07-10) Beispiele 1-3,5,9	1-18
X	KOBAYASHI, N. ET AL.: "Specificity of Polyclonal Antibodies Raised against a Novel 24,25-Dihydroxyvitamin D3-Bovine Serum Albumin Conjugant Linked through the C-11-alpha or C-3 Position" J. STEROID BIOCHEM. MOLEC. BIOL., Bd. 62, Nr. 1, 1997, Seiten 79-87, XP002119849 Seite 82, Spalte 1, Zeile 1-30	1,2,5, 7-11,13, 18

-/---

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Oktober 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Janus, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/04418

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HIGASHI, T. ET AL.: "Enzyme-linked immunosorbent assay for plasma 24,25-dihydroxyvitamin-D3" ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 365, Nr. 1-3, 1998, Seiten 151-158, XP002119850 das ganze Dokument	1,2,5, 7-11,13, 18
A	EP 0 312 360 A (TOYO JOZO KK) 19. April 1989 (1989-04-19) in der Anmeldung erwähnt	1-18

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04418

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9724127 A	10-07-1997	AU 1429397 A	28-07-1997
		CA 2239617 A	10-07-1997
		EP 0873126 A	28-10-1998
EP 0312360 A	19-04-1989	JP 2000274 A	05-01-1990
		DE 3872153 A	23-07-1992
		US 5075465 A	24-12-1991
		US 5202266 A	13-04-1990

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**